



Hinc patriam sustinet

**Instituto Superior de Agronomia**  
**Universidade Técnica de Lisboa**



**UNIVERSIDADE TÉCNICA DE LISBOA**

**Faculdade de Medicina Veterinária**

**EFEITOS DO COBRE NO SARGO (*Diplodus sargus*, Linnaeus  
1758): IMPLICAÇÕES QUER A NÍVEL FISIOLÓGICO, QUER DE  
CRESCIMENTO**

**CRISTIANA LOURENÇO DE OLIVEIRA VAZ**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM ENGENHARIA ZOOTÉCNICA –  
PRODUÇÃO ANIMAL**

**CONSTITUIÇÃO DO JÚRI**

Doutora Luísa Almeida L. Falcão e Cunha

Doutor Francisco d'Assis Lopes Ruano

Doutora Maria Madalena dos Santos Lordelo

Doutor Fernando Ribeiro Alves Afonso

**ORIENTADOR**

Doutora Florbela Maria B. Soares

**CO – ORIENTADOR**

Doutor Fernando R. Alves Afonso

2011

LISBOA

Aos meus pais, Maria Cristina Vaz e Ivo Vaz,  
por tudo.

“Não é o mais forte que sobrevive,  
Nem o mais inteligente,  
mas o que melhor se adapta às mudanças.”

Charles Darwin



## **Agradecimentos**

Ao Professor Doutor Fernando Afonso, da Faculdade de Medicina Veterinária, por ter prontamente aceite e co-orientado este trabalho, com ajudas e conselhos valiosos na escrita desta tese, pelo seu suporte e pela disponibilidade demonstrada durante o decorrer deste estudo.

À Doutora Florbela Soares, da Estação Piloto de Piscicultura de Olhão (EPPO), pela disponibilidade com que aceitou orientar este trabalho, pelas suas palavras de motivação conselhos e, pela sua paciência.

Ao Doutor Pedro Pousão-Ferreira, responsável pela Estação de Piscicultura de Olhão (EPPO), por esta oportunidade única, pela sua experiência, pela orientação e ensinamentos ao longo do decorrer dos ensaios.

A toda a equipa do IPIMAR que me aceitaram como um deles, pela cumplicidade, simpatia, pela ajuda e apoio, pelo vosso espírito de equipa, pelo vosso sentido de humor e confraternização. Agradeço em especial à Marisa pela amizade e por tudo o que me ensinou. À Ana Isabel, Ana Margarida, Catarina, Ezequiel, Hugo, Miguel, Sara e Paulo Jorge por se mostrarem sempre disponíveis para ajudar e, para me ensinarem o que quer que seja assim como, pelos conselhos oferecidos. À Doutora Laura pela boa disposição e à Doutora Mi pela simpatia. Obrigada pelo bom ambiente.

À Mónica, ao Márcio, ao Gil e ao Artur por me terem ajudado quando eu mais precisava dispensando os seus trabalhos, pelas palavras de motivação e confiança, apoio, conselhos, paciência, incentivos, alegria e sobretudo pela grande e forte amizade que daqui nasceu.

Ao Tiago e ao João que por várias vezes se deslocaram à EPPO para me ajudarem nas amostragens.

À Dona Maria do Rosário, do laboratório de Histologia da Faculdade de Medicina Veterinária, por me ter ensinado e ajudado em toda a parte laboratorial relativamente ao processamento dos cortes histológicos. Pelos conselhos, paciência, simpatia e amizade demonstrada durante todo o processo.

À Doutora Belmira Carrapiço, responsável pelo laboratório de Farmacologia e Toxicologia da Faculdade de Medicina Veterinária, por ter aceite a realização das análises necessárias a este estudo.

À Engenheira Adriana Belas, do laboratório de Farmacologia e Toxicologia da Faculdade de Medicina Veterinária, por me ter ensinado a realizar as análises toxicológicas e pela sua disponibilidade.

À Paula, do laboratório de Farmacologia e Toxicologia da Faculdade de Medicina Veterinária, por ser uma pessoa incansável e prestável, pela amizade e palavras de motivação.

Ao Ricardo Chambel pelos conselhos fulcrais na escrita desta dissertação e por toda a ajuda dispensada durante estes últimos meses.

Aos meus pais, que me educaram e fizeram de mim o que sou hoje, que tornaram possível a realização deste sonho, que sempre me apoiaram incondicionalmente; pelo amor, carinho, incentivo e paciência tida ao longo deste percurso. Agradeço especialmente à minha mãe, por ter sempre uma palavra meiga de motivação e, força para me dar enquanto ela própria estava a passar por uma fase difícil. Ao meu pai, por nunca me deixar olhar para trás e me fazer acreditar que eu sou capaz de tudo.

À minha irmã, pelo apoio, por ver sempre o lado positivo das situações e, principalmente por, apesar de mais nova, ser um exemplo de vida e de coragem para mim e, por ser um dos grandes pilares da família.

Aos meus avós, que infelizmente neste momento alguns já não se encontram presentes, pelo apoio e pela preocupação tida ao longo do decorrer desta dissertação. Agradeço em especial ao meu avô Joaquim pelos conselhos dados na escrita da mesma.

Ao João por toda a paciência e dedicação e, por me ajudar em tudo o que eu preciso.

À restante família por todo o apoio.

À Marta, pelas horas infinitas ao telemóvel quando me encontrava no Algarve e por todo a amizade e paciência demonstrada.

A todos os que se interessam pela minha dissertação de mestrado.

## **Efeitos do cobre no Sargo (*Diplodus sargus*, Linnaeus 1758): implicações quer a nível fisiológico, quer de crescimento**

### **Resumo**

O recente crescimento da aquacultura, juntamente com a introdução de novas espécies de peixes em sistemas de produção intensivos, levou a um aumento da ocorrência e diversidade de agentes patogénicos. O sulfato de cobre tem sido amplamente utilizado para a prevenção e controlo de ectoparasitas, contudo, pode tornar-se tóxico a altas concentrações, comprometendo a integridade fisiológica dos peixes. Deste modo, o objectivo deste estudo foi analisar os efeitos de diferentes concentrações de cobre a nível da toxicidade deste sobre diferentes tecidos, a nível do crescimento e comportamento de juvenis de sargo (*Diplodus sargus*). Neste estudo, os indivíduos foram, durante um período de 23 dias, expostos a 0,2 mg L<sup>-1</sup>, 0,5 mg.L<sup>-1</sup> e 1 mg.L<sup>-1</sup> de cobre. Num segundo ensaio submeteram-se juvenis de sargo com um peso médio de 70,71 ± 18,89 g a concentrações de cobre de 0,25 mg.L<sup>-1</sup> e 0,5 mg.L<sup>-1</sup>, durante 60 dias. Os resultados demonstraram que a concentração de cobre no fígado difere significativamente entre os tratamentos testados e, que no músculo não existiam diferenças significativas. As observações dos tecidos revelaram diversas alterações ao nível da estrutura do tecido branquial e hepático, entre os indivíduos expostos a diferentes tratamentos. O grau de alterações morfológicas observadas diferiu de acordo com o período de exposição e com o tratamento experimental. No entanto, também foram detectadas alterações de intensidade variável entre indivíduos expostos ao mesmo tratamento. Estas serão, possivelmente, devido a diferentes mecanismos de adaptação às diferentes concentrações. O tratamento prolongado com cobre não parece influenciar o crescimento dos indivíduos. A análise comportamental reflecte que houve diferenças significativas entre os indivíduos controlo e os indivíduos expostos ao cobre, na quantidade de alimento consumido.

Palavras-Chave: *Diplodus sargus*, Sargo, Cobre, Toxicidade.

## Effects of copper on white seabream (*Diplodus sargus*, Linnaeus 1758):physiological implications and growth

### Abstract

The recent growth of aquaculture and the introduction of new species of fish in intensive production systems, contributed to the occurrence of more and new pathogenic agents. Copper sulfate has been widely used for the prevention and control of parasites. However, it can be toxic at high concentrations, compromising the physiologic integrity of the fish. The objective of this study the effects of the copper in the tissues, in the growth and in the behavior of juvenile sea bream (*Diplodus sargus*). In this study, the fish were exposed, during a period of 23 days, to 0.2 mg.L<sup>-1</sup>, 0.5 mg.L<sup>-1</sup> and 1 mg.L<sup>-1</sup> of copper. In a second trial, juvenile sea bream, with an average weight of 70.71 ± 18.89g, were submitted to concentrations of copper of 0.25 mg.L<sup>-1</sup> and 0.5 mg.L<sup>-1</sup> for 60 days. The results show that the concentration of copper in the liver is significantly different among the treatments. In the muscle, there were no significant differences. In the tissues, it was observed several changes on the normal structure of the gills and of the hepatic tissues, among the individuals exposed to different treatments. The degree of morphological changes was different according to the period of exposure and to the experimental treatment. We also detected variable level changes among individuals exposed to the same treatment. It suggests that might exist different adaptation mechanisms, dependent on the copper concentrations. The duration of the copper treatment doesn't seem to influence the growth of the fish. The behavioral analysis, regarding the amount of food consumed shows that there were important differences in the group subjected to copper treatment when compared to the control group.

Keywords: *Diplodus sargus*, White seabream, Copper, Toxicity

## Índice

1. Introdução .....	1
2. O Sargo, <i>Diplodus sargus</i> (Linnaeus, 1758).....	2
2.1 Caracterização Biológica da espécie.....	2
2.2 Patógenos comuns no sargo e tratamentos.....	6
3. Cobre .....	10
3.1 Propriedades e Constituintes.....	10
3.2 Metabolismo e Principais Funções .....	11
3.3 Cobre como substância terapêutica.....	14
3.4 Concentrações e Toxicidade .....	15
4. Objectivos.....	21
5. Materiais e Métodos .....	22
5.1 Animais .....	22
5.2 Circuito Experimental.....	23
5.3 Tratamento: Doses e Duração .....	24
5.4 Amostragem Biológica .....	25
5.5 Quantificação do cobre .....	26
5.6 Procedimentos histológicos .....	27
5.7 Análise de Crescimento .....	27
5.8 Análise Comportamental .....	28
5.9 Análise estatística .....	28
6. Resultados.....	30
6.1 Ensaio 1.....	30
6.1.1 Qualidade da água .....	30
6.1.2 Mortalidade .....	32
6.1.3 Quantificação de Cobre.....	33
a) Fígado.....	33
b) Músculo .....	35
6.1.4 Histologia .....	36
a) Brânquias .....	37
b) Fígado .....	40
6.2 Ensaio 2.....	43
6.2.1 Qualidade da água .....	43
6.2.2 Mortalidade .....	44
6.2.3 Quantificação de Cobre.....	45
a) Fígado.....	45
b) Músculo .....	47



6.2.4 Histologia .....	48
a) Brânquias .....	49
b) Fígado .....	53
c) Intestino.....	56
6.2.5 Análise de Crescimento.....	57
6.2.6 Análise Comportamental.....	58
a) Comportamento Alimentar .....	58
b) Comportamento Natatório .....	59
c) Cor.....	59
7. Discussão dos Resultados.....	61
7.1 Qualidade da água e Mortalidade .....	61
7.2 Quantificação de cobre .....	62
a) Fígado.....	63
b) Músculo .....	65
7.3 Histologia.....	66
a) Brânquias .....	66
b) Fígado .....	69
c) Intestino.....	70
7.4 Efeitos do cobre no crescimento .....	70
7.5 Alterações no comportamento .....	71
8. Considerações Finais .....	73
9. Referências Bibliográficas.....	75
10. Anexos.....	87
Anexo A – Tabelas das análises toxicológicas.....	87
Anexo B – Procedimento histológico.....	98
Anexo C – Testes estatísticos efectuados.....	99
Anexo D – Publicações decorrentes deste trabalho.....	102

## Lista de Figuras

Figura 1 - Produção Global em Aquacultura de Diplodus Sargus (FAO, 2008).....	2
Figura 2 – Diplodus sargus.....	2
Figura 3 - Distribuição do Sargo, Diplodus sargus (Fishbase, 2010).....	3
Figura 4 - Circuito Experimental.....	23
Figura 5 - Medição e pesagem de um indivíduo (Diplodus sargus).....	26
Figura 6 - Diferença de cor entre os sargos (Diplodus sargus) (clara versus escuro) .....	28
Figura 7 - Oscilações da concentração de cobre na água durante o período de exposição ao tratamento 1, 2 e 3.....	31
Figura 8 - Mortalidade acumulada dos juvenis Diplodus sargus expostos a diferentes concentrações de cobre ( $\text{Cu}^{2+}$ ) associado ao sulfato de cobre ( $\text{CuSO}_4$ ) durante o período em que decorreu o ensaio (1 a 23 dias) .....	32
Figura 9 - Concentração de cobre no músculo e no fígado dos juvenis Diplodus sargus aquando das amostragens (0; 16;23 dias) nos diferentes tratamentos (controlo, 1, 2 e 3) .....	33
Figura 10 - Concentração de cobre no fígado de Diplodus sargus no grupo de controlo, tratamento 1 ( $0,2 \text{ mg.L}^{-1}$ de Cu), tratamento 2 ( $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$ de Cu) e tratamento 3 ( $1 \text{ mg.L}^{-1}$ de Cu) durante o período de exposição ao $\text{CuSO}_4$ (1 a 23 dias). Os valores são as médias $\pm$ DP.....	34
Figura 11 - Concentração de cobre no músculo de Diplodus sargus no grupo de controlo, tratamento 1, 2 e 3 durante o período de exposição ao $\text{CuSO}_4$ (1 a 23 dias). Os valores são as médias $\pm$ D.P. (n = variável).....	35
Figura 12 - Secções histológicas representativas das brânquias de Diplodus sargus.....	39
Figura 13 – Secções histológicas representativas do fígado de Diplodus sargus.....	41
Figura 14 - Distribuição, em percentagem, dos organismos (Diplodus sargus) expostos a concentrações subletais de cobre, pelos diferentes níveis de alteração do tecido hepático .....	42
Figura 15 - Mortalidade acumulada dos juvenis de Diplodus sargus expostos a diferentes concentrações de cobre ( $\text{Cu}^{2+}$ ) associado ao sulfato de cobre ( $\text{CuSO}_4$ ) durante o período em que decorreu o ensaio (60 dias) .....	44
Figura 16 - Concentração de cobre no músculo e no fígado dos juvenis Diplodus sargus aquando das amostragens (0; 15; 30; 45 dias) nos diferentes tratamentos (controlo, 1 e 2) .....	45
Figura 17 - Concentração de cobre no fígado de Diplodus sargus no grupo de controlo, tratamento 1 ( $0,25 \text{ mg.L}^{-1}$ de Cu) e tratamento 2 ( $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$ de Cu) durante o período de exposição ao $\text{CuSO}_4$ (1 a 60 dias). Os valores são as médias $\pm$ D.P. (n = 9). Existem diferenças significativas entre os tratamentos se as letras forem diferentes ( $p < 0,05$ ) .....	46
Figura 18 - Concentração de cobre no músculo de Diplodus sargus no grupo de controlo, tratamento 1 e 2 durante o período de exposição ao $\text{CuSO}_4$ (60 dias). Os valores são as médias $\pm$ D.P. (n=9) .....	48
Figura 19 - Secções histológicas representativas das brânquias de Diplodus sargus referentes ao tratamento 1 ( $0,25 \text{ mg.L}^{-1}$ ) durante o decorrer do ensaio (60 dias).....	51
Figura 20 - Secções histológicas representativas das brânquias de Diplodus sargus referentes ao tratamento 2 ( $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$ ) durante o decorrer do ensaio (60 dias).....	52
Figura 21 - Secções histológicas do fígado de Diplodus sargus expostos a $0,25 \text{ mg.L}^{-1}$ de cobre (Tratamento 1) durante o decorrer do ensaio (60 dias). .....	54
Figura 22 - Secções histológicas do fígado de Diplodus sargus expostos a $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$ de cobre (Tratamento 2) durante o decorrer do ensaio (60 dias). .....	55
Figura 23 - Distribuição, em percentagem, dos organismos (Diplodus sargus) expostos a concentrações subletais de cobre, pelos diferentes níveis de alteração do tecido hepático .....	56

Figura 24 - Secções histológicas representativas do intestino de <i>Diplodus sargus</i> .....	56
Figura 25 - Índice de condição do <i>Diplodus sargus</i> durante o período de exposição ao cobre (60 dias). Os dados apresentados são médias $\pm$ D.P. ( $n = 120$ e $n = 18$ , na primeira amostragem e restantes, respectivamente) .....	57
Figura 26 - Comparação da quantidade de alimento ingerido pelos peixes ( <i>Diplodus sargus</i> ) entre os diferentes tratamentos ( $0,25 \text{ mg.L}^{-1}$ e $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$ ) e o grupo controlo. Existem diferenças significativas se as letras forem diferentes ( $p < 0,05$ ) .....	58
Figura 27 - Predominância, em % de dias, dos indivíduos utilizados neste ensaio referentes ao grupo controlo e aos dois tratamentos ( $0,25 \text{ mg.L}^{-1}$ e $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$ ) na superfície, coluna de água e no fundo dos respectivos tanques. ....	59
Figura 28 - Predominância, em % de dias, da percentagem de indivíduos que permaneceram escuros durante o decorrer do ensaio .....	60

## Lista de Tabelas

Tabela 1 Patógenos comuns no <i>Diplodus sargus</i> (Adaptado de Sasal et al., 1997 e Rigos et al., 2010)	7
Tabela 2- Temperatura, oxigénio dissolvido e concentração de cobre (média $\pm \sigma$ ) observadas durante o decorrer do ensaio (23 dias)	30
Tabela 3 – Alterações morfológicas das brânquias de <i>Diplodus sargus</i> ao longo do primeiro ensaio	37
Tabela 4 - Temperatura, oxigénio dissolvido e concentração de cobre (média $\pm \sigma$ ) observados durante o decorrer do ensaio (60 dias)	43
Tabela 5 – Alterações morfológicas das brânquias de <i>Diplodus sargus</i> durante o segundo ensaio	49



## 1. Introdução

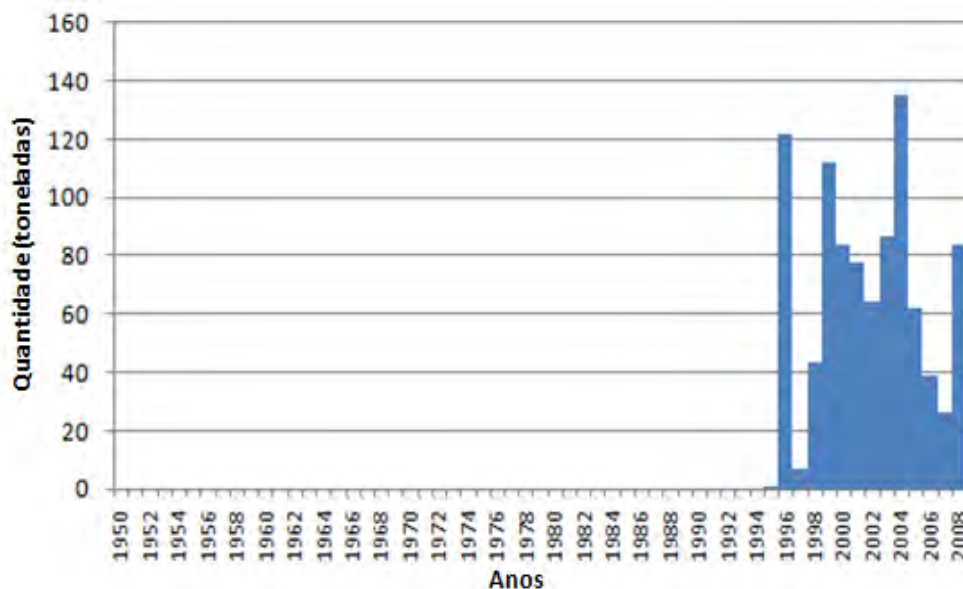
A aquacultura é uma actividade que se está a desenvolver, a expandir e a intensificar em quase todas as regiões do mundo, devido, em parte, ao aumento da procura de produtos alimentares de origem aquática. As pescas têm estado a atingir o seu potencial máximo, levando à sobre-exploração de vários recursos marinhos e, conseqüentemente, à diminuição desta actividade. Em contraste, a aquacultura a nível mundial tem aumentado durante os últimos 50 anos, desde uma produção inferior a um milhão de toneladas até 59,4 milhões de toneladas em 2008 (Fernandes et al., 2009).

A introdução de novas espécies com alto valor comercial e com potencialidades para a sua exploração em aquacultura tem recentemente atraído o interesse de muitos piscicultores, diversificando e aumentando a oferta de produtos aquícolas no mercado.

O sargo (*Diplodus sargus*, Linnaeus 1758), é uma espécie Mediterrânica com alto valor comercial, verificando-se, por vezes, preços superiores aos da dourada e do robalo (Sá et al. 2008). Tem atraído um elevado interesse junto dos piscicultores desde a década de 1980 (Golomazou et al., 2006), visto considerar-se um alvo potencial para a diversificação da aquacultura. As técnicas de produção necessárias nesta espécie são semelhantes às desenvolvidas para os Sparídeos (*Sparus aurata* e *Dicentrarchus labrax*) já utilizados em aquacultura (Abellan & Basurco, 1999; Pérez et al., 2008), favoráveis à sua criação em cativeiro, nomeadamente no que se refere a taxas de sobrevivência e índices de crescimento, sendo as épocas de reprodução diferentes da dourada e do robalo (Pousão-Ferreira et al., 1997). O controlo da reprodução, os reprodutores, a incubação dos ovos, a fase larvar, e a criação de juvenis em aquacultura são objectivos que já vêm sendo alcançados (Papoutsoglou et al., 2006; Sá et al., 2006; Karakatsouli et al., 2007).

A produção de sargo em aquacultura, relatada desde 1995, tem sido fraca, e concentra-se maioritariamente na Grécia, mas também em França e Espanha (Basurco et al., 2010). O máximo de produção foi atingido em 1996, com 122 toneladas, mas em 2006 apenas 38 toneladas foram produzidos na Grécia (Basurco et al., 2011). O ano de menor produção, a nível global, foi o de 1995; seguindo-se um grande aumento produtivo, em 1996, e, desde então, a produção de sargo tem oscilado bastante, atingindo um máximo em 2004 (Figura 1).

**Figura 1** - Produção Global em Aquacultura de *Diplodus Sargus* (FAO, 2008)



## 2. O Sargo, *Diplodus sargus* (Linnaeus, 1758)

### 2.1 Caracterização Biológica da espécie

A espécie *Diplodus sargus* Linnaeus, 1758, de nome vulgar sargo (Figura 2), é classificada, segundo Whitehead et al. (1986):

Figura 2 – *Diplodus sargus*

Reino: Animalia

Filo: Cordata

Classe: Actinopterygii

Ordem: Perciformes

Família: Sparidae

Gênero: *Diplodus* Radidasque, 1810

Espécie: *Diplodus sargus* Linnaeus, 1758

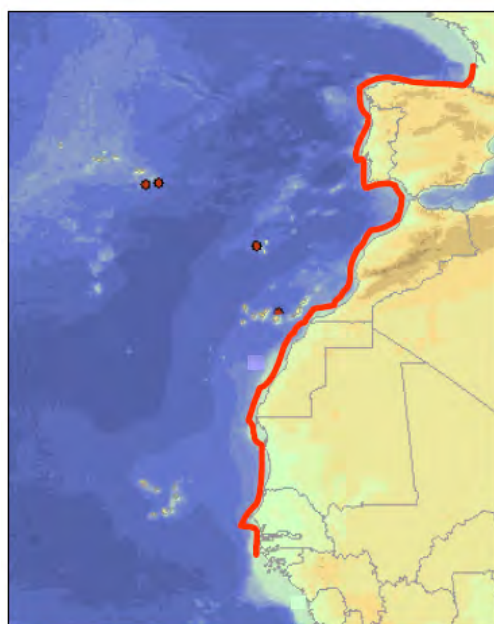


O sargo apresenta um corpo oval, elevado e comprimido dorso-ventralmente, com uma cauda bifurcada. Possui boca com lábios finos, e ligeiramente protátil (distensão anterior dos maxilares no momento da ingestão da presa). Em cada mandíbula tem 8 incisivos (excepcionalmente, 10 na mandíbula superior), molares atrás dos incisivos e na região

dianteira das mandíbulas dispostos em várias séries, 3 a 4 (raramente 5) na mandíbula superior e 2 a 3 séries (raramente 4) na mandíbula inferior (FAO, 2011). As branquicténias são 9 a 12, na região superior, e 6 a 9, na região inferior (FAO, 2011). A barbatana dorsal tem 11 a 12 espinhos (raramente 13) e 12 a 16 raios moles (FAO, 2011). A barbatana caudal tem 3 espinhos e 12-14 raios moles (FAO, 2011). A linha lateral termina na base caudal e compõe-se por 58 a 67 escamas (FAO, 2011). A coloração do *D. sargus* é cinza prateada, apresentando o espaço inter-ocular e a região nasobucal mais escuros, exibindo 9 riscas, muito escuras e claras, alternadamente, o pedúnculo caudal tem a aresta superior escurecida logo atrás dos últimos raios dorsais; existe uma mancha escura na zona axilar superior das barbatanas peitorais; as barbatanas dorsal e caudal são aclaradas e mais escuras na zona distal (FAO, 2011). A aresta traseira da barbatana caudal é preta (FAO, 2011). Em geral, os exemplares adultos mostram uma tonalidade mais escura que os juvenis e que os indivíduos de tamanhos médios (Bauchot et al., 1981; Bauchot, 1987; Bauchot & Hureau, 1990). O tamanho desta espécie, em adulto, pode variar entre os 15 e os 30 cm, podendo atingir os 45 cm de comprimento (Basurco et al., 2011).

Esta espécie distribui-se pelas costas do Mediterrâneo, Índico e Atlântico, desde o Golfo da Biscaia até às Ilhas Canárias (Figura 3). No arquipélago das Canárias, é frequente em todas as ilhas, embora pareça ser mais abundante nas ilhas orientais (Malheiro, 2007). A sua presença é muito rara no Mar Negro (FAO, 2010).

Figura 3 - Distribuição do Sargo, *Diplodus sargus* (Fishbase, 2010)





O habitat preferencial dos sargos coincide com as zonas litorais, de fundos rochosos ou arenosos, nomeadamente na proximidade de rochas (Pereira et al., 2010). É comum encontrar-se até aos 50m na costa Mediterrânica, mas pode habitar os 150m de profundidade (Malheiro, 2007). É uma espécie eurihalina, que se desloca na Primavera para águas salobras, nomeadamente lagunas, regressando ao mar no fim do Outono, onde habita nos bancos de *Posidonia oceânica* (Malheiro, 2007).

Os juvenis caracterizam-se por serem omnívoros, e o seu regime alimentar, no meio natural, é constituído à base de larvas, anfípodes e algas. Os adultos são carnívoros e, por vezes, agrupam-se em portuários, independentemente do tipo de fundo, onde se alimentam de restos de peixe rejeitados pelos pescadores. O que significa que para além de se alimentarem preferencialmente de, moluscos, pequenos crustáceos, algas, poliquetas e equinodermes, são também necrófagos (Cardigos, 2011). Esta espécie mantém associações alimentares com outros peixes, como por exemplo os salmonetes (*Mullus surmuletus*) - os sargos aproveitam o trabalho dos salmonetes para se alimentarem de pequenos organismos que são levantados durante as escavações (Cardigos, 2011).

Apresentam um comportamento gregário e agrupam-se em quantidades numerosas. Os juvenis tendem a formar grupos mais pequenos, geralmente entre 10 e 30 peixes. Dentro dos grupos, as relações são definidas, verificando-se uma estrutura hierárquica linear (pelo menos em condições de laboratório). Estas relações são afectadas por parâmetros sócio-ambientais, o que se poderá traduzir num aumento da predisposição para gerar comportamentos agressivos entre os indivíduos (Caballero, 2002).

O sargo é uma espécie hermafrodita - os machos podem converter-se em fêmeas quando o número destas é demasiado baixo, característica designada por hermafroditismo protândrico. Esta estratégia permite assegurar uma adequada proporção dos dois sexos, contribuindo para o sucesso reprodutor da espécie. A inversão de sexo no *Diplodus sargus* parece caracterizar-se histologicamente pela atrofia e degenerescência das gónadas masculinas; este fenómeno pode-se verificar desde o fim da época de postura e subsequente desenvolvimento oogénico, levando à formação de oócitos em estado vitelogénico avançado. A inversão sexual inicia-se no decurso do terceiro ano de vida e completa-se no quinto ano (Lenfant, 2003). A maturidade sexual ocorre aos 2 anos de idade, e a reprodução ocorre entre Março e Junho (Morato et al., 2003). À semelhança de outros Sparídeos, o desenvolvimento ovocitário não é síncrono, apresentando posturas sucessivas durante a época reprodutiva. As larvas são pelágicas e, decorrido um mês, as pós-larvas assentam em áreas bênticas pouco profundas, onde permanecem durante vários meses. Após atingirem um comprimento de 4,5-5 cm, os juvenis

dispersam-se para além das áreas de “nursery” e integram-se na população adulta (Lenfant, 2003).

As primeiras tentativas de produção do sargo foram realizadas no início de 1980. Há também algumas referências que descrevem ensaios em cativeiro na Grécia, durante a década de 1990 (Basurco et al., 2011). A maturação dos reprodutores e a desova em pisciculturas não apresentam grandes limitações, e os ovos podem ser facilmente obtidos por desova espontânea, embora o número de ovos produzidos possa ser menor comparativamente com o número de ovos produzidos pelas douradas, por exemplo. Relativamente às larvas, tem-se obtido um bom crescimento e elevadas taxas de sobrevivência em regimes intensivos de produção, e, mais recentemente, com regimes semi-intensivos (Basurco et al., 2011). Embora o desempenho global de crescimento durante os estados larvares (60-90 dias) seja melhor do que na dourada, o mesmo não acontece durante as fases de crescimento e engorda (Sá, et al. 2008). Abellán e García-Alcázar (1995) observaram que os juvenis de sargo demoram 4,5 meses para aumentarem 3-20g de peso vivo, enquanto a dourada demora apenas 2 meses. O baixo desempenho na performance também foi observado durante a fase de engorda, o que fez com que o sargo fosse considerado um fraco candidato para a aquacultura (Abellán e García-Alcázar, 1995). No entanto, as preocupações recentes da indústria da aquacultura sobre a futura disponibilidade de farinha e óleo de peixe, e o aumento dos preços provocou um elevado interesse dos piscicultores em produzir espécies omnívoras, como é, naturalmente, o exemplo do sargo (Basurco et al., 2011). O fraco crescimento desta espécie pode dever-se ao facto de que esta e outras espécies do mesmo género têm sido alimentadas com ração comercial desenvolvida especificamente para as douradas e robalos (Sá et al., 2008). Estudos recentes têm demonstrado que esta espécie se desenvolve bem sob um elevado espectro de proteína na dieta, sugerindo uma menor exigência de proteína e um melhor uso dos hidratos de carbono (Sá et al., 2008). Além disso, devido à sua natureza omnívora, ao bom crescimento larvar e às elevadas taxas de sobrevivência, o sargo tem sido recentemente utilizado em experiências de repovoamento associado a recifes artificiais, tanto na Itália (Golfo de Castellammare) como em Portugal (costa Algarvia), indicando que esta espécie pode ser adequada para repovoamento (Basurco et al., 2011).

## 2.2 Patógenos comuns no sargo e tratamentos

A patologia constitui um factor limitante ao desenvolvimento da cultura de algumas espécies. Na realidade é difícil avaliar economicamente o que as perdas provocadas por patologias podem representar nesta actividade. O aparecimento de uma doença nos peixes é o resultado da interacção entre patógenos, hospedeiros e o meio ambiente (Toranzo et al., 2005).

A natureza da aquacultura e as melhores técnicas para a prevenção de doenças são a antítese directa uma da outra. O aumento do lucro da aquacultura prevê o maior crescimento dos animais num pequeno volume de água. Os métodos preventivos de doenças baseiam-se em manter densidades o mais baixo possível possibilitando um intervalo espacial entre os peixes. O lucro é o principal objectivo da aquacultura; assim, a densidade vai estar sempre maximizada, e, portanto, existe uma maior probabilidade de ocorrência de doenças (Owens, 2003). Os agentes patogénicos descritos nos sistemas de aquacultura são os normalmente presentes em populações de peixes selvagens. No entanto, em ambientes naturais, raramente causam mortalidade, devido à inexistência das condições de stress que geralmente ocorrem nas pisciculturas (Toranzo et al., 2005).

O recente crescimento da indústria de aquacultura, juntamente com a introdução de novas espécies de peixes (*Diplodus puntazzo*, *Dentex dentex*, *Pagellus* spp., *Diplodus sargus* entre outros) em sistemas de produção intensiva levou a um aumento da ocorrência de patógenos diferentes (García-Rosado et al., 2007 e Rigos et al., 2010), e, para além deste facto, os dados sobre a biologia, produção e patologia do *D. sargus* são muito limitados, dificultando o seu tratamento (Golomazou et al., 2006). As principais classes de organismos patogénicos identificados em animais marinhos são as bactérias, os vírus, os fungos e os parasitas (Hawke, 2003). Alguns dos principais patógenos que podem aparecer no sargo estão descritos na tabela 1.

Tabela 1 - Patógenos comuns no *Diplodus sargus* (Adaptado de Sasal et al., 1997 e Rigos et al., 2010)

Patógenos	Bactérias		<i>Photobacterium damsella</i> subsp. <i>piscidia</i>
			<i>Vibrio alginoliticus</i>
			<i>Vibrio fischeri</i>
			<i>Listonella anguillarum</i>
			<i>Pseudomonas</i> sp.
	Parasitas	Myxozoa	<i>Enteromyxum leei</i>
			<i>Kudoa</i> sp.
			<i>Myxobolus</i> sp.
		Ciliophora	<i>Cryptocaryon irritans</i>
		Monogenea	<i>Lamellodiscus sanfilippii</i>
			<i>Microcotyle</i> sp.
			<i>Furnestinia</i> sp
		Isopoda	<i>Gnathia vorax</i>
		Mastigophora	<i>Amyloodinium ocellatum</i>
	Vírus		Necrose nervosa viral
			Septicemia hemorrágica viral
	Outras Patologias		Nefrocalcinose

Os surtos de bactérias causam sérios problemas e têm sido principalmente induzidos por *Photobacterium damsella* subsp. *piscidia* e *Vibrio alginoliticus* (Rigos et al., 2010). Os parasitas mais prejudiciais para a aquacultura do sargo são o *Enteromyxum leei*, *Cryptocaryon irritans* e o dinoflagelado *Amyloodinium ocellatum* (Rigos et al., 2010), devido à sua alta patogenicidade, fecundidade e resistência aos meios de controlo.

A amiloodiniose é uma doença parasitária cujo agente etiológico é o *Amyloodinium ocellatum* (Ramos, 2006). É um dinoflagelado termofílico e eurialino, caracterizado por ter uma elevada taxa de multiplicação, um ciclo de vida curto (trifásico), uma grande tolerância às variações ambientais, e as suas infecções são assíncronas. Posto isto, o *Amyloodinium ocellatum* é considerado o protozoário ectoparasita mais patogénico e difícil de controlar, constituindo uma séria preocupação para os piscicultores (Eiras, 1994; Almeida, 2005; Ramos, 2006). A proliferação deste parasita, provoca elevadas mortalidades (Ramos &

Oliveira, 2001), sendo necessário e urgente tomar medidas eficazes e adequadas para a sua prevenção, assim como para o seu tratamento. Este parasita atinge principalmente as brânquias, mas também a pele (Noga, 1996), e os principais sinais da ocorrência deste são: coçar-se no fundo ou em objectos que possam existir no tanque; constante abertura de boca; falta de apetite; natação errática; ocorrência de manchas brancas na pele e barbatanas; e, no caso de infestações mais avançadas, olhos opacos (Almeida, 2005; Júnior, 2009). As lesões histopatológicas incluem a inflamação das brânquias, hemorragias e hiperplasia. Ainda que não haja medidas de prevenção e controlo específicas para evitar esta doença, algumas regras de manejo de carácter geral podem ser úteis no controlo das vias de infestação diminuindo, mas não eliminando, o risco de introdução do parasita, tais como a quarentena e vigilância do peixe que entra na piscicultura, com uma duração de 14 a 20 dias, assim como o controlo da qualidade da água que entra na piscicultura (Noga, 1996; Ramos & Oliveira, 2001; Almeida, 2005), e a minimização do fluxo de ar, sempre que possível, entre os tanques das incubadoras e das instalações dos reprodutores. Os procedimentos inadequados de quarentena e biossegurança são tipicamente os responsáveis pelo acesso destes parasitas aos tanques terra. As vias de entrada deste parasita incluem, provavelmente, a introdução de reprodutores, pelo alimento ou ineficiente filtração da água de entrada (Roberts-Thomson, 2006). Quando é diagnosticado, é necessária uma intervenção rápida, nomeadamente na implementação de um tratamento eficaz contra o *Amyloodinium ocellatum* e seguro para o peixe, de forma a prevenir uma rápida perda de “stock” (Ramos & Oliveira, 2001; Ramos, 2006). Embora a forma livre (dinosporo) seja susceptível à quimioterapia, a forma vegetativa (trofonte) e os estádios de esporulação (tomonte) são resistentes, o que torna a erradicação difícil, isto porque, para além de exigir tratamentos prolongados, de modo a permitir que todos os trofontes e tomontes formem dinosporos (Noga, 1996), também exige o controlo periódico de reinfestação. Registe-se, ainda, a limitação da sua aplicação quando o peixe se destina ao consumo humano (Ramos & Oliveira, 2001). Schawarz e Smith (2002) referem métodos, de natureza física e química, de controlo da amiloodiniose. Os de natureza física, pela renovação e filtração da água, lavagem e desinfecção dos circuitos, visam minimizar o grau de infestação do *Amyloodinium ocellatum*, removendo fisicamente os tomontes enquistados antes da libertação dos dinosporos e evitam a reinfestação. Há referências de banhos em água doce durante alguns minutos, com o mesmo pH e à mesma temperatura, para desalojar os trofontes antes de implementar qualquer tratamento (Ramos & Oliveira, 2001; Almeida, 2005; Álvarez-Pellitero). Uma vez libertados, os dinosporos podem ser mortos com radiação ultra-violeta (Noga, 1996). A desvantagem deste método é que demonstra ser muito stressante para o peixe (Almeida, 2005). A diminuição da temperatura da água do tanque e a redução da iluminação

podem ser utilizadas para atrasar o ciclo de vida do parasita e assim prolongar a vida do peixe (Noga, 1996; Ramos & Oliveira, 2001). As infestações por este parasita não surgem a menos de 17 °C, uma vez que os tomontes param de se dividir a baixas temperaturas, mas podem vir a ser produzidos dinosporos quando colocados a 25 °C, mesmo após quatro meses a 15 °C (Noga, 1996). Os dinosporos permanecem infestantes durante pelo menos seis dias a 26 °C (Noga, 1996), podendo chegar aos quinze dias sem hospedeiro (Almeida, 2005). Contudo, o recurso à quimioterapia e à manipulação das condições do meio são passíveis de ser implementados em sistemas de produção intensiva para o controlo da doença. Mas nos sistemas de produção em tanques-terra, o facto de se trabalhar com elevadas cargas de peixe, em tanques de grande dimensão e com acrescidos volumes de água, expostos às condições ambientais e em que a água é renovada com a maré, estes proporcionam condições ideais à dispersão do parasita quer através de aerossóis, quer através da água e ainda, pelo contacto entre os peixes (Ramos, 2005). Os únicos medicamentos comprovadamente eficazes contra este parasita são o cobre e a cloroquina difosfato (Almeida, 2005). Noga e Levy (1995) relataram sobre o sucesso do tratamento químico com cloroquina difosfato (um medicamento anti-malária), por ser muito seguro e eficaz em matar os dinosporos. Não é tóxico para os peixes, mas é-o para as algas e muitos invertebrados. A concentração de cloroquina difosfato deve estar entre 5 a 10 mg/L, durante 10 dias. O uso de sulfato de cobre também tem revelado alguma eficácia no tratamento do *Amyloodinium ocellatum*, sendo mesmo usado como profiláctico. Porém o sulfato de cobre tem um efeito altamente adstringente no epitélio branquial e tóxico para o fígado (Ramos, 2001). Em aquariofilia, por exemplo, a concentração de cobre tem de se manter entre 0,15 e 0,25 mg/L durante 3 semanas para exterminar o parasita, sendo o cobre extremamente tóxico para os invertebrados e para as algas do aquário, assim como a cloroquina difosfato, só podendo ser usado em tanques-hospital (Almeida, 2005). Segundo Álvarez-Pellitero o sulfato de cobre com uma concentração de 0,75 mg/L, durante 12 a 14 dias, ajuda a controlar os dinosporos. O cobre não afecta os trofontes nem os tomontes mas é tóxico para os dinosporos (Noga e Levy, 1995). Outros produtos têm sido ensaiados: azul-de-metileno, formalina, acriflavina e peróxido de hidrogénio (Ramos, 2001).

### 3. Cobre

#### 3.1 Propriedades e Constituintes

O cobre é um elemento químico de símbolo Cu, número atômico: 29 (29 prótons e 29 elétrons), de massa atômica: 63,54, ponto de fusão: 1983,4 °C, ponto de ebulição: 2567 °C, densidade 8,9 g.cm<sup>-3</sup> a 20 °C, e tem dois isótopos estáveis: <sup>63</sup>Cu e <sup>65</sup>Cu, com uma abundância natural de 69,2% e 30,8%, respectivamente (Georgopoulos et al., 2001). Classificado como metal de transição, é o primeiro elemento do grupo 11 (IB) da tabela periódica e a maioria dos seus compostos apresenta estados de oxidação baixos, sendo mais comum o Cu<sup>2+</sup> (ião cúprico), ainda que existam alguns com estado de oxidação Cu<sup>+</sup> (ião cuproso) e Cu<sup>3+</sup>, tendo uma forte tendência para formar iões complexos, principalmente através de ligações covalentes. Pode-se encontrar presente quer no estado nativo, livre, quer combinado com outros elementos, constituindo os minérios metálicos. Destes ressaltam os sulfuretos, que são os minérios de cobre mais comuns, tais como calcopirite (CuFeS<sub>2</sub>), bornite (Cu<sub>5</sub>FeS<sub>4</sub>), calcocite (Cu<sub>2</sub>S) e a covelite (CuS), os óxidos como a cuprite (Cu<sub>2</sub>O) e os carbonatos de que são exemplo a azurite (2CuCO<sub>3</sub>.Cu(OH)<sub>2</sub>) e a malaquite (CuCO<sub>3</sub>.Cu(OH)<sub>2</sub>) (ATSDR, 2004). É lentamente dissolvido em amônia diluída e lentamente atacado por halogéneos à temperatura ambiente mas rapidamente por ácidos orgânicos e minerais que contêm um agente oxidante (Tong et al., 1999; Georgopoulos et al., 2001). Os óxidos e os sulfitos também reagem com o cobre. Em solução aquosa o Cu (II), ou o ião Cu<sup>2+</sup>, é o estado de oxidação normal dos respectivos complexos metálicos, sendo o Cu (I) o estado característico dos complexos aquosos insolúveis. Complexos Cu (III) encontram-se em reduzido número, sendo instáveis em solução aquosa. A estabilidade relativa dos complexos de Cu(I) e Cu(II) em solução, para além de depender da natureza dos ligantes presentes, varia com a composição da solução (Peres, 1991). Os complexos Cu (II) são os mais importantes para os sistemas aquáticos, não só pela sua estabilidade em solução, como também pela sua grande diversidade (Peres, 1991). O Cu(I) é mais instável no intervalo de pH mais comum (por exemplo, pH 6 – 8) e oxidado a Cu(II) pelo ar. Os compostos Cu (II) são, geralmente, mais solúveis a pH baixo, ou seja, em águas ácidas. O cloreto de cobre (II), o nitrato e o sulfato são altamente solúveis em água. O ião Cu<sup>2+</sup> é altamente reactivo e forma complexos moderados a fortes que precipitam com muitos componentes orgânicos e inorgânicos presentes na água, como, por exemplo, carbonatos, fosfatos ou aminoácidos, e é facilmente adsorvido na

superfície por sólidos em suspensão. O cobre pode ser co-precipitado ou adsorvido, estando disponível, directa ou indirectamente, para os organismos (Tong et al., 1999).

O cobre encontra-se naturalmente presente nas águas como metal vestigial, geralmente em concentrações inferiores a  $5 \mu\text{g.L}^{-1}$ , embora por acção antropogénica possa atingir concentrações de vários  $\text{mg.L}^{-1}$  (Alabaster e Lloyd, 1980). No meio aquático, a biodisponibilidade do cobre é afectada por vários parâmetros físicos e químicos, como por exemplo, a presença de catiões, o pH, a dureza, a temperatura e o oxigénio dissolvido (Peres, 1991). Por exemplo, um pH alto diminui a adsorção do cobre; a pH constante o que vai influenciar a adsorção do cobre é a salinidade (Georgopoulos et al., 2001). A presença de matéria orgânica na água também influencia a biodisponibilidade do cobre, uma vez que o ião cúprico forma complexos orgânicos que precipitam e se depositam no sedimento.

As propriedades físicas e químicas do cobre tornam-no um dos metais de transição mais importantes para a indústria, podendo ter várias aplicações, sendo utilizado, principalmente, na produção de material eléctrico e tintas, na indústria têxtil, na agricultura, em insecticidas, fungicidas, algicidas, conservantes de madeiras, baterias entre outros.

### **3.2 Metabolismo e Principais Funções**

O cobre é um oligoelemento, por ser um elemento que faz parte da constituição dos seres vivos mas que ocorre em concentrações muito baixas, sendo essencial para os processos biológicos por ser fundamental para a formação de enzimas vitais para determinados processos bioquímicos. É um elemento de transição abundante na crosta terrestre. É fundamental à vida pois desempenha um papel importante em diversos processos bioquímicos, sendo fundamental para o crescimento e desenvolvimento dos organismos, incluindo os aquáticos (Vieira et al., 2009; Shao et al., 2010). O cobre é um elemento essencial que intervém no metabolismo celular, nomeadamente no associado a proteínas, metaloenzimas e de alguns pigmentos de ocorrência natural, e funciona como co-factor para vários processos enzimáticos (Sobral e Widdows, 1997; Grosell et al., 2007; Munari & Mistri, 2007; Monteiro et al., 2009). É essencial para a síntese de hemoglobina, a partir da utilização de ferro, sendo um estimulante da hematopoiese, formação normal dos ossos, manutenção de mielina no sistema nervoso, no tracto gastrointestinal, bem como na protecção de células contra a destruição por oxidação, ou seja é um componente de um grande número de proteínas e enzimas que desempenham funções biológicas fundamentais às células e que contribuem para a manutenção da homeostase (Arredondo e Núñez, 2005; Cao et al., 2010; Shao et al., 2010). Por exemplo, é encontrado em algumas enzimas como a citocromo c oxidase, à qual é



responsável pela maior parte (provavelmente mais de 90%) do oxigénio consumido pelos seres vivos e pela fotossíntese; a enzima do citossol superóxido-dismutase, que desdobra cataliticamente o radical livre tóxico, ião superóxido ( $O_2^-$ ), gerado durante o metabolismo aeróbio; a lisil oxidase; e como elemento central da proteína hemocianina, que é um pigmento respiratório equivalente à hemoglobina humana, de artrópodes e moluscos para o transporte de oxigénio, requerendo por isso um sistema de regulação para os processos de absorção, armazenamento e excreção (Harper et al., 1982). Ou seja, proteínas que estão implicadas nas reacções de oxidação-redução, na produção de energia e noutros processos fisiológicos. É portanto, essencial para a respiração em todas as células eucarióticas (Grosell et al., 2004). Nestas proteínas, o cobre encontra-se ligado com outros grupos azotados, oxigenados e sulfurados (Peres, 1991). O cobre também é importante como parte de enzimas antioxidantes (por exemplo, Cu-Zn SOD) (Shao et al., 2010; Zhao et al., 2010). Em geral, as funções biológicas do cobre envolvem a catálise de transferência de electrões.

O cobre ingerido é absorvido, na sua maioria, na primeira porção do intestino delgado (15-80%), através de mecanismos que não estão completamente conhecidos, e uma pequena porção é absorvida pelo estômago. Sabe-se que a captação pelo epitélio intestinal é facilitada por transportadores específicos e não específicos, localizados na membrana em borda estriada (Wapnir, 1998). A eficiência da absorção do cobre é, geralmente, de 20 a 50%, sendo controlada pela necessidade de cobre do organismo e regulada pela metalotioneína das células intestinais (Tapieiro et al., 2003). O cobre absorvido pelas células da mucosa intestinal é transportado para a circulação sanguínea, ligado, primeiramente, à albumina, transcupreína e ligantes de baixo peso molecular como alguns aminoácidos: histidina, metionina e cisteína (Jacob et al., 1987). A maior parte do cobre absorvido é mobilizado para o fígado - cerca de 65% do teor de cobre no fígado corresponde à fracção solúvel e apenas 8% às mitocôndrias, e incorporado à ceruloplasmina, e uma pequena parte é transportada para o rim (Peres, 1991). A absorção depende da ingestão. Na baixa ingestão, a absorção ocorre por transporte activo saturado, devido à concentração da substância a transportar ser baixa. Na alta ingestão, a absorção ocorre por difusão passiva. Quando a ingestão é elevada, o cobre hepático pode ser incorporado à metalotioneína, proteína considerada como um agente importante de desintoxicação nos humanos e ratos (Suzuki et al., 2002). As células hepáticas possuem um sistema bem integrado no controlo da quantidade de cobre intracelular (Gaetke e Chow, 2003). O cobre, primeiramente, é transportado para dentro das células, ligado a uma ou mais proteínas transmembranares. No citoplasma, o cobre liga-se a um grupo de proteínas receptoras (metalochaperones) que direccionam e transferem o cobre para as estruturas celulares contendo diversas apo-cuproproteínas, substâncias sem a incorporação do cobre.

Quando o cobre intracelular está elevado, as ATPases que transportam o cobre são redistribuídas para dentro de vesículas citoplasmáticas. Estas vesículas contêm o *pool* de cobre intracelular destinado ao refluxo, através de mecanismos de exocitose, contribuindo, portanto, para evitar a acumulação de cobre intracelular. Outro mecanismo secundário de controlo da toxicidade do cobre intracelular ocorre através de metalotioneínas, que são proteínas ricas em cisteína com afinidade por iões de metais pesados, como é o exemplo do cobre e zinco (Gaetke e Chow, 2003). Cada molécula de metalotioneína é capaz de se ligar a 12 átomos de cobre, zinco e cádmio. O seu papel parece ser de armazenamento dos iões metálicos que se encontram em excesso, evitando a intoxicação. Este papel torna-se importante quando o processo de refluxo celular do cobre está comprometido, ou quando há exposição aguda a elevadas concentrações de cobre (Bremner, 1987). O mecanismo primário que regula a homeostase de cobre no organismo é a sua excreção, evitando que o cobre seja acumulado em excesso. A principal via de excreção do cobre é através da bÍlis, originada de fragmentos de ceruloplasmina proveniente do catabolismo hepático (Tapieiro et al., 2003). O cobre é excretado principalmente pelas fezes e, em pequenas quantidades, pelo suor e pela urina. A adequada função destes mecanismos favorece o carácter antioxidante do cobre, enquanto que a inadequada propicia o seu carácter pró-oxidante.

O metabolismo do cobre nos peixes ocorre de forma idêntica (Grosell et al., 2001). A absorção de cobre nos peixes ocorre a partir de duas vias: pelas brânquias (exposição através da água), e por meio da ingestão de alimentos que contêm concentrações elevadas desse composto. Após ser absorvido, o cobre é transferido a partir do sangue aos órgãos alvo. Nos peixes, o teor de cobre no fígado varia consoante a espécie e o regime alimentar (Peres, 1991).

A necessidade de cobre nos vários órgãos ou nos sistemas do organismo é regulada por mecanismos de controlo homeostáticos. A toxicidade do cobre deve-se à sua afinidade por grupos tiol; o cobre é capaz de se ligar à cisteína, histidina e metionina formando complexos e tornando as macromoléculas não funcionais, ocorrendo quando o organismo é exposto a elevadas concentrações, e quando tais mecanismos de controlo dentro de um determinado compartimento são sobrecarregados e/ou quando os mecanismos de reparação celular são destruídos (Pedrozo, 2003; Monteiro et al., 2009; Munari & Mistri, 2007; Vieira et al., 2009).

O cobre é, portanto, um elemento benéfico exigido por todos os organismos marinhos, sendo, no entanto, um dos mais venenosos metais, quando presente em excesso (Sobral e Widdows, 1997).

### 3.3 Cobre como substância terapêutica

O cobre era usado pelos cidadãos do Império Romano, muito antes de se conhecer a existência de microrganismos, para melhorar a saúde pública. Eles perceberam que a água transportada através deste material era segura para beber e que os utensílios de cobre para cozinhar ajudavam a prevenir doenças (Anónimo, 2011). Acredita-se que, tanto os antigos egípcios quanto os chineses, usaram o cobre para fins terapêuticos - informações mais detalhadas sobre estes factos estão descritas por Hipócrates, que prescreveu compostos de cobre para doenças pulmonares e outras, cerca de 400 anos antes de Cristo (Georgopoulos et al., 2001).

Na agricultura, o maior uso do cobre encontra-se na formulação de fungicidas devido a diversas doenças que apareciam nas sementes. Devido às suas propriedades fungicidas e bactericidas, o sulfato de cobre foi usado, para além disso, nos campos como desinfectante contra a putrefacção de sementes armazenadas, e para a prevenção de certas doenças de animais, como os problemas das unhas geralmente encontrados em ovelhas, por exemplo (Anónimo, 2011).

Na aquacultura, o sulfato de cobre ( $\text{CuSO}_4$ ) é um produto de grande aplicabilidade, sendo utilizado para a redução da quantidade de fitoplâncton, controlo de parasitas e de problemas de origem bacteriana. Além disso, muitos produtores têm utilizado o sulfato de cobre para o tratamento de doenças causadas por fungos, bactérias, platelmintos e nemátodos ectoparasitas, ou, ainda, como tratamentos profiláticos. É normalmente usado por intermédio de banhos (Varo et al., 2007). A solução de sulfato de cobre é regularmente usada para a prevenção e controlo de ectoparasitas, protozoários do género *Cryptocarion* e *Amyloodinium*, do *Ichthyophthirius multifilii*, assim como de bactérias, enquanto que são usadas tintas à base de cobre, nos tanques, para impedir a fixação de organismos encrostantes (Ling e Tan, 1990; Fernandes et al., 2007; Fernandes et al., 2009; Han et al., 2001; Peyghan et al., 2003; Rowland et al., 2009; Varo et al., 2007). O  $\text{CuSO}_4$  também protege os peixes contra as infecções bacterianas causadas pelo *Flavobacterium columnare*. Esta protecção parece ser devida à absorção do cobre pelo epitélio ou mucosa superficial dos peixes, assim como se mostrou eficaz em eliminar o *P. parvum* de lagoas (MacFarlane et al., 1986; Smith, 2005). As condições de tratamento são muito variáveis, e os banhos podem durar de vários minutos a vários dias (Varo et al., 2007). O sulfato de cobre, devido à sua actividade biológica para as algas, tem sido utilizado desde 1904 no seu controlo em águas superficiais (Hullebusch et al., 2002). É habitualmente aplicado em viveiros de aquacultura em Taiwan para erradicar algas filamentosas, assim como em lagoas, para reduzir a abundância de fitoplâncton, incluindo

*Microcystis* sp., bem como outras algas verde-azuladas (Wu et al., 2003). Reddy et al. (2005) e Hullebusch et al. (2002) observaram que a concentração de sulfato de cobre utilizado como algicida pode chegar a  $1 \text{ mg.L}^{-1}$ , dependendo das características físico-químicas da água e do tipo de utilização do sistema aquático, o que demonstra não ser tóxico para os peixes mas sim para um grande número de invertebrados e, por esta razão, a dose recomendada para o uso do sulfato de cobre em crustáceos é da ordem dos  $0,1\text{-}0,5 \text{ mg.L}^{-1}$ . De acordo com Ling et al. (1993), a concentração de  $288 \text{ } \mu\text{g.L}^{-1}$  de sulfato de cobre aumentou a taxa de sobrevivência do peixe *Carassius auratus* contra *I. multifiliis*. Peixes expostos ao sulfato de cobre por 120 minutos tiveram uma taxa de sobrevivência de 88,9% quando comparados com peixes expostos por 30 e 60 minutos, que tiveram taxas de sobrevivência de 33,3 e 55,6%, respectivamente. Os peixes que não foram tratados com sulfato de cobre apresentaram uma taxa de sobrevivência de 5,6 %. De acordo com Yanong (2009),  $0,15\text{-}0,20 \text{ mg.L}^{-1}$  de  $\text{Cu}^{2+}$  é eficaz no controlo de parasitas importantes na produção de peixes, tais como *Amyloodinium* e *Cryptocaryon*, muitas espécies de algas, invertebrados indesejáveis e peixes parasitas. O cobre é essencialmente tóxico para as algas porque reduz a fotossíntese, inibe a divisão celular e impede a fixação do azoto pelas cianofíceas (Horne e Goldman, 1974). Contudo, a aplicação deste produto pode gerar efeitos adversos, uma vez que podem ser tóxicos para organismos não-alvo. Para além disso, a morte das algas pode libertar toxinas em concentrações suficientemente altas para causar danos a outras espécies e comprometer a qualidade da água.

### 3.4 Concentrações e Toxicidade

O cobre é um metal essencial à vida, no entanto, quando em excesso, torna-se tóxico para os organismos, comprometendo a sua integridade fisiológica. Por este motivo, têm sido desenvolvidos diversos estudos relativos à toxicidade deste metal em diversos grupos de seres vivos, desde invertebrados aquáticos a peixes e até em humanos. Apesar dos inúmeros artigos publicados sobre a toxicidade do cobre em peixes, a maioria refere-se a espécies de água doce, havendo pouca informação disponível relativamente a espécies marinhas.

No ser humano, a concentração de cobre num adulto de 70 Kg é, em média, 110 mg: 10 mg no fígado, 8,8 mg no cérebro, 6 mg no sangue, 3 mg no rim e 26 mg no músculo. As necessidades humanas de cobre são, aproximadamente, 2 a 3 mg por dia (NAS, 1980). Embora uma dieta normal possa fornecer entre 1 a 10 mg de Cu por dia, estudos americanos, europeus e alguns asiáticos mostram que a actual dieta apenas fornece uma média diária de 2 e 6 mg de Cu por pessoa (EPA, 1985) e que o consumo real pode ser inferior a 2 mg, com base na análise do alimento (Klevay, 1977). A fonte mais provável de exposição do Homem

ao cobre é a água de consumo (ATSDR, 2004). O risco de toxicidade do cobre para o Homem é reduzido, devido às características organolépticas deste elemento que evitam o seu consumo, existindo uma razoável margem de segurança, não sendo, portanto, considerado como um risco para a saúde pública (Clark, 2001). Os valores máximos de cobre fixados pela legislação para a água de consumo humano seguem critérios de natureza organoléptica, não se encontrando relacionados com eventuais riscos sanitários. No caso da actual directiva comunitária relativa à qualidade da água para consumo humano (Directiva 98/83/CE – DL 243/2001), o cobre é indicado entre parâmetros químicos de doseamento obrigatório, sendo fixado o valor de 2 mg.L<sup>-1</sup>. O valor indicativo estabelecido pela OMS é de 1 mg.L<sup>-1</sup>, limite este imposto, mais uma vez, por razões organolépticas e não toxicológicas.

Em geral, as necessidades diárias de cobre para os peixes variam entre 1 a 4 mg.Kg<sup>-1</sup> de Cu de peso seco (Bury et al., 2003). Contudo, a partir de determinadas concentrações poderá tornar-se tóxico e, dependendo da sensibilidade do organismo, pode causar mortalidade ou stress sub-letal (Varo et al., 2007; Boeck et al., 2010; Liu et al., 2010; Zhao et al., 2010). A toxicidade do cobre varia muito consoante as espécies e a sua biodisponibilidade e depende do estágio de desenvolvimento, da idade, do tamanho, da actividade, do ciclo produtivo e *status* nutricional (Pelgrom, 1994). Concentrações entre 0,02 e 10 mg.L<sup>-1</sup> de cobre podem ser letais para algumas espécies de peixe (Alabaster e Lloyd, 1980). O cobre é o metal que, geralmente, apresenta maior toxicidade depois do mercúrio (Hg) e da prata (Ag), apesar de os organismos possuírem sistemas de regulação que promovem a sua desintoxicação e armazenamento (Clark, 2001). Relativamente aos limites máximos de resíduos de medicamentos veterinários nos alimentos de origem animal, em 1990 foi efectuado o Regulamento (CEE) número 2377/90 do Conselho no qual foi estabelecido um procedimento comum para a determinação desses resíduos. Durante anos consecutivos, este regulamento foi corrigido e modificado. No dia 27 de Novembro de 1998 foi realizado o Regulamento (CEE) número 2560/98 do Conselho, em que os anexos I e II do Regulamento (CEE) número 2377/90 do Conselho foram alterados. Este Regulamento determinou que o sulfato de cobre deve ser incluído no anexo II, que diz respeito às substâncias às quais não é necessário estabelecer um limite máximo de resíduos para a protecção da saúde pública (Anónimo, 1998). Assim, não é necessário estabelecer um período de segurança relativamente ao consumo destes peixes (Diaz, 2006). Regulamentos mais recentes (R208/2005, R 78/2005, R 684/2004, R 466/2001, R 2375/2001, D 2005/10, D 2005/4 D 2004/44, D 22/2001, R 221/2002, o Conselho recomenda 2002/201, 2004/705 e 2005/108 D 69/2002) determinam o nível máximo de metais pesados, Dioxinas e PCB nos produtos da pesca, de amostras e métodos de análises. Nenhuma legislação europeia, nem a portuguesa, estabelecem um limite

de Cu (Anónimo, 1999). No Reino Unido o limite estabelecido para o consumo humano é de  $20 \mu\text{g.g}^{-1}$  de peso seco (Nauen, 1983). Em Espanha, o Estatuto Real 61/2005, 256/2003, RS 604/2003 e da ordem SCO/3767/2004 determinam os métodos de amostras e de análise dos métodos. O Ministério da Saúde e Consumo Ordem 08/02/91 que determina os limites de metais não revogou ainda o Regulamento Europeu (cobre e estanho). O limite de cobre em peixes, cefalópodes frescos, congelados, conservas e semi-preparados, moluscos, bivalves e gastrópodes em todas as preparações é de  $20 \mu\text{g.g}^{-1}$  de peso seco. Nos crustáceos, em todas as preparações é de  $20 \mu\text{g.g}^{-1}$ , excepto em ostras e conquilhas, que têm como limite máximo  $60 \mu\text{g.g}^{-1}$  (Anónimo, 1991).

A exposição ao cobre apresenta diversas alterações nos peixes, tais como: precipitação de muco e alterações físicas nas brânquias, que provoca complicações respiratórias e implica um aumento do consumo de energia para restaurar a homeostase, para aumentar o consumo de oxigénio; stress agudo provocado por uma maior libertação de cortisol, promovendo a glicogénese e o aumento dos níveis de glicose na circulação sanguínea; stress oxidativo; redução do índice de condição corporal; diminuição do apetite; sistema imunológico enfraquecido; alterações nos processos celulares e na actividade enzimática; desordens no fígado e nos rins; possível alteração ou inibição de vários passos do processo reprodutivo; e provocar deformidades vertebrais (Alabaster e Llyod, 1980; Boeck et al., 2010; Cao et al., 2010; Grosell et al., 2004; Grosell et al., 2007; Liu et al., 2010; Sikorska e Wolkicki, 2010; Varo et al., 2007; Waser et al., 2010; Wu et al., 2003). Assim, quando expostos a diversos níveis de cobre na água, os peixes podem sofrer alterações histopatológicas em diferentes órgãos (Bernet et al., 1999) e acumular resíduos do metal essencial nas brânquias e no fígado (Daglish e Nowak, 2002). Para além da toxicidade aguda, os organismos aquáticos podem sofrer efeitos crónicos quando expostos a baixas concentrações de agentes tóxicos por longos períodos de tempo; estes caracterizam-se por: mudanças comportamentais, como natação errática; diminuição da relação presa – predador; alterações fisiológicas; crescimento retardado; alterações bioquímicas e histológicas (Boeck et al., 2010; Fernando et al., 2009; Martinez-López et al., 2007; Nowak et al., 1996; Rand e Petrocelli, 1985; Waser et al., 2010; Wu et al., 2003).

Em estudos de toxicidade do cobre, as brânquias e o fígado dos peixes são usualmente considerados como órgãos-alvo. Existe uma maior acumulação deste metal no fígado e no rim, podendo também haver acumulação dos iões de cobre no músculo, mas em menor quantidade. No entanto, devido à grande massa muscular, tal deve ser tido em consideração para a homeostase geral do cobre, para além de poder ser prejudicial para a saúde humana, se

estes peixes forem consumidos após o tratamento (Arrelano et al., 1999; Cerqueira e Fernandes, 2002; Grosell et al., 2001; Peyghan et al., 2003; Waser et al., 2010).

As brânquias, do ponto de vista morfológico e fisiológico, são um órgão muito complexo que está envolvido em diversas funções vitais, tais como a respiração, a osmorregulação, o equilíbrio ácido-base e a excreção, e apresentam uma grande área superficial em contacto com o meio exterior, o que as torna uma principal região de absorção de cobre (Cerqueira e Fernandes, 2002; Mazon et al., 2002a; Grosell et al., 2002).

Durante a exposição ao cobre, as brânquias acumulam quantidades elevadas deste metal. A sua avaliação morfológica permite detectar alterações, mesmo quando o organismo se encontra exposto a baixas concentrações (Mazon et al., 2002b). Os efeitos tóxicos do cobre nas brânquias durante as exposições agudas e crónicas, através de alterações histopatológicas na estrutura branquial e de parâmetros fisiológicos, foram observados em diversos estudos (Arrelano et al., 1999; Cerqueira e Fernandes, 2002; Grosell e Wood, 2002; Grosell et al., 2007; Liu et al., 2010; Wepener et al., 2001; Zhao et al., 2010). Contudo, apenas alguns autores evidenciaram a reversibilidade dos danos causados pela exposição dos peixes ao cobre (Karan et al., 1998; Cerqueira e Fernandes, 2002).

As lesões mais frequentemente observadas por acção do cobre são as seguintes: a hiperplasia (aumento do volume do tecido devido a um acréscimo no número de células, sem que haja alterações no volume celular); a hipertrofia (aumento do volume celular ou do tecido, sem que se verifique o aumento no número de células); a secreção do muco e a necrose (estado morfológico da célula ou do tecido que surge após a perda irrevogável das funções celulares) (Bernet et al., 1999).

Relativamente ao fígado, este é constituído por um sistema de células hepáticas, hepatócitos, sustentado por uma rede de sinusóides. Os hepatócitos apresentam uma forma poliédrica bem definida, contêm um núcleo esférico e central e grande volume citoplasmático. Uma das funções do fígado enquanto glândula é a secreção biliar, contudo as células hepáticas realizam muitas outras funções. O fígado desempenha um papel importante no metabolismo e subsequentemente na excreção de substâncias tóxicas (Bernet et al., 1999; Liu et al., 2010; Mazon e Fernandes, 1999; Zhang et al., 2005), constituindo-se como principal órgão de acumulação e desintoxicação (Peyghan et al., 2003). Durante a exposição ao cobre, o fígado pode acumular elevadas quantidades deste metal (Arrelano et al., 1999; Peyghan et al., 2003; Kraemer et al., 2005). A excreção biliar de cobre é elevada em situações de elevada absorção de cobre, e pode ser, também, realizada a partir das brânquias, sendo de grande importância na homeostase de todo o organismo (Grosell et al., 2001). A sua análise histopatológica permite detectar diversas alterações a nível do tecido, tais como a perda de integridade e

alterações ao nível dos hepatócitos, nomeadamente hipertrofia, presença de núcleos picnóticos e alterações na quantidade de glicogénio. A exposição ao cobre também pode interferir em diversas vias metabólicas e induzir várias respostas bioquímicas, tais como perturbações a nível lipídico e no metabolismo de lipoproteínas e induzir a ocorrência de fígado gordo nos peixes (Liu et al., 2010).

A exposição *in vivo* de alevinos de dourada ao sulfato de cobre produziu stress oxidativo, e a peroxidação lipídica aumentou com o aumento das concentrações de sulfato de cobre (Varo et al., 2007). Na truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*), a exposição ao cobre durante apenas quatro horas a 104,86 µg provocou hipoxia no epitélio branquial (Varo et al., 2007). Vieira et al. (2009) observaram alterações comportamentais na espécie *Pomatoschistus microps* quando exposta a concentrações iguais ou superiores a 50 µg.L<sup>-1</sup> de cobre, na *Esomus danricus* quando exposta a 2,5-10 mg.L<sup>-1</sup> de sulfato de cobre e para o *Salmo trutta* quando exposto a 10 mg.L<sup>-1</sup> de cloreto de cobre. Adultos da espécie *Solea senegalensis* foram expostos a dose sub-letal de cobre por sete dias e após este período, foram mantidos por quatro dias sem exposição ao cobre (período de depuração). Os níveis de cobre nas brânquias e no fígado aumentaram durante a exposição sub-letal. Durante o período de depuração, a concentração de cobre diminuiu nas brânquias e no fígado, indicando que este metal é eliminado com certa facilidade dos organismos a ele expostos (Arrelano et al., 1999). De acordo com Fonseca et al. (2009), a exposição de juvenis *Solea senegalensis* a altas concentrações de cobre tem problemas fisiológicos directos, expressos a partir da diminuição de crescimento e da condição corporal, mesmo sob condições ideais de alimentação.

O sulfato de cobre pode ser muito tóxico dependendo da concentração em que é utilizado. Além disso, factores ambientais como o pH, dureza, alcalinidade, concentração de amónia (o cobre é tóxico para as bactérias nitrificantes e inibe a oxidação de amónia e nitrito, portanto, aumenta os níveis de amónia e nitrito no sistema), sólidos dissolvidos, como por exemplo cascas de ostras ou corais que são ricas em carbonato de cálcio e têm a capacidade de adsorver o cobre que se encontra livre no meio aquático e a presença de substâncias dissolvidas que se podem ligar ao cobre reduzindo a sua actividade, oxigénio dissolvido, condutividade eléctrica, temperatura, salinidade, presença ou ausência de outros metais podem actuar sinergeticamente e, factores fisiológicos, como o nível alimentar dos animais e densidade populacional, podem também influenciar a toxicidade do cobre (Nowak et al., 1996; Sobral e Widdows, 1997; Yanong, 2009; Waser et al., 2010). A dureza da água interfere na toxicidade das substâncias porque a concentração de catiões polivalentes reduz a biodisponibilidade dos metais tóxicos. Quando o pH é baixo os metais tornam-se mais biodisponíveis aumentando o risco de toxicidade (Georgopoulos et al., 2001; Yanong, 2009).



Wurts e Perchbacher (1994) observaram que a toxicidade de cobre diminui com o aumento da alcalinidade e da dureza da água em testes de toxicidade aguda (48 horas) com o *Ictalurus punctatus*. Pilgaard et al. (1994), constataram que baixas concentrações de oxigénio dissolvido aumenta a sensibilidade dos peixes ao cobre.

#### 4. Objectivos

O presente trabalho teve como objectivo estudar os possíveis efeitos secundários do uso de sulfato de cobre ( $\text{CuSO}_4$ ) no tratamento de diversos parasitas, nomeadamente o *A. ocellatum*, em juvenis de sargo – *Diplodus sargus* (L. 1758), através do estudo da mortalidade, da sua capacidade de bioacumulação, análise histopatológica, de crescimento e comportamento desta espécie.

Deste modo, este estudo foi repartido em dois ensaios. O primeiro ensaio teve como principal objectivo definir quais as concentrações de cobre mais plausíveis de serem utilizadas nas pisciculturas, de modo a que não afectem a integridade fisiológica dos peixes, não colocando em risco a saúde pública. No segundo ensaio, com as concentrações definidas, o objectivo foi a observação de uma exposição mais prolongada dos indivíduos em contacto com o sulfato de cobre, para posteriormente se proceder a estudos de alteração e acumulação histológica ao nível dos diferentes tecidos e, à avaliação do efeito que esta exposição provoca no crescimento e comportamento destes organismos.

## **5. Materiais e Métodos**

Os ensaios, e todas as tarefas associadas à recolha e preparação de amostras, foram realizados na Estação Piloto de Piscicultura de Olhão (EPPO) do INRB, I.P. – IPIMAR, situada no Parque Natural da Ria Formosa. As análises químicas de cobre e histológicas foram efectuadas na Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Técnica de Lisboa.

### **5.1 Animais**

No Ensaio 1 foram utilizados 180 juvenis de sargos com  $48,07 \pm 16,4$  g (média  $\pm$  D.P.) de peso total e  $12,8 \pm 1,49$  cm (média  $\pm$  D.P.) de comprimento total, estabulados na EPPO do INRB, I.P. – IPIMAR. Estes encontravam-se acondicionados num tanque de 1500 L de capacidade, funcionando em sistema de circuito aberto, com água previamente filtrada proveniente do reservatório da Estação. Este era, por sua vez, abastecido com água da Ria Formosa purificada em filtros de areia, mantendo-se a salinidade entre 32 e 37‰ e temperatura entre 15 e 25°C, dependendo das condições climáticas. Os animais encontravam-se sujeitos ao fotoperíodo natural e a aeração constante. Os juvenis de sargos eram alimentados 3 vezes por dia, sendo o seu regime alimentar constituído por granulado comercial “AquaGold 5” 2 mm (Aquasoja, SORGAL, S.A., Ovar, Portugal).

No ensaio 2 foram utilizados 360 juvenis de sargo com  $70,71 \pm 18,89$  g (média  $\pm$  D.P.) de peso vivo e  $15,44 \pm 1,34$  cm (média  $\pm$  D. P.) de comprimento total, estabulados na EPPO do INRB, I.P. – IPIMAR. Estes encontravam-se acondicionados num tanque de 9000 L de capacidade, em condições idênticas aos dos juvenis utilizados no Ensaio 1, variando apenas o tipo de granulado comercial, sendo este “Balance 3a” 3 mm (Aquasoja, SORGAL, S.A., Ovar, Portugal).

## 5.2 Circuito Experimental

Os ensaios foram realizados em sistema de circuito aberto, composto por 9 tanques cilíndrico-cónico azuis, em fibra de vidro, com capacidade de 300 L, dispostos em paralelo, a que correspondem 3 tratamentos com 3 replicados cada (Figura 4).

Figura 4 - Circuito Experimental



Antes de entrar no sistema, a água foi sujeita a um processo de filtração através de um filtro de areia e de um filtro de saco de 1 mm. A entrada de água processa-se por cima e a saída faz-se à superfície.

No Ensaio 1 o fluxo de entrada de água nos tanques, foi de 45 Litros por Hora, o que corresponde a uma renovação de água de 15% por hora. No Ensaio 2, o fluxo foi de 75 L.H<sup>-1</sup>, ou seja, uma renovação de água de 25% por hora. Estes valores baseiam-se nas renovações típicas dos tanques de terra da EPPO, proporcionando também um maior tempo possível de exposição ao sulfato de cobre.

Apesar da renovação contínua da água nos tanques, verificou-se uma acumulação de detritos orgânicos provenientes dos restos de alimento e do próprio metabolismo do peixe, facto que contribui para o aumento dos níveis de amónia e nitrito em solução. Assim, os tanques eram aspirados diariamente. Procedeu-se também à lavagem dos filtros e à realização de purgas que, conjuntamente, contribuíam para a manutenção das boas condições dos tanques.

O arejamento manteve-se sempre constante em todos os tanques.

O fotoperíodo foi controlado e estipulado a 14D:10N.

A iluminação foi efectuada por lâmpadas de halogéneo, dispostas no tecto da sala, de modo a abranger todo o circuito experimental. A intensidade luminosa foi de 600 lux.

Diariamente foram monitorizados a temperatura ( $^{\circ}\text{C}$ ) e o oxigénio dissolvido na água ( $\text{mg.L}^{-1}$  e %), com o auxílio de um oxímetro.

A alimentação foi fornecida quatro vezes ao dia (9:30 h; 14h:00 h; 17:30 h; 21:00 h), de modo a saciar os peixes, utilizando a mesma dieta adoptada na EPPO mencionada anteriormente.

Os peixes foram medidos, pesados e distribuídos de forma aleatória pelos 9 tanques do ensaio. Nos Ensaio 1 e 2, os peixes tiveram um período de aclimatização de 7 e 3 dias, respectivamente, para se adaptarem às condições experimentais (tipo de alimentação, regime alimentar, qualidade da água, fotoperíodo, densidade e manutenção dos tanques).

### **5.3 Tratamento: Doses e Duração**

Para garantir uma concentração de sulfato de cobre (cristais com 25% (p/p) de cobre sob a forma de sulfato de cobre) o mais semelhante possível ao que pode ser observado nas explorações aquícolas ao longo de um dia num tanque, adicionou-se o  $\text{CuSO}_4$  à água duas vezes por dia (diluído anteriormente num copo com a mesma água do tanque), 10:00 h e 17:00 h, de modo a permitir uma maior exposição ao tratamento durante o tempo em que decorreu a experiência.

No Ensaio 1, colocaram-se 20 peixes em cada tanque; os diferentes tratamentos utilizados foram:

- Tratamento 1: 0,2 mg de  $\text{Cu L}^{-1}$  (0,8  $\text{mg.L}^{-1}$  de  $\text{CuSO}_4$ )
- Tratamento 2: 0,5 mg de  $\text{Cu L}^{-1}$  (2  $\text{mg.L}^{-1}$  de  $\text{CuSO}_4$ )
- Tratamento 3: 1 mg de  $\text{Cu L}^{-1}$  (4  $\text{mg.L}^{-1}$  de  $\text{CuSO}_4$ )

No Ensaio 2, colocaram-se 40 peixes em cada tanque; os diferentes tratamentos utilizados foram:

- Grupo de controlo: 0 mg de  $\text{Cu.L}^{-1}$
- Tratamento 1: 0,25 mg de  $\text{Cu.L}^{-1}$  (1  $\text{mg.L}^{-1}$  de  $\text{CuSO}_4$ )
- Tratamento 2: 0,5 mg de  $\text{Cu.L}^{-1}$  (2  $\text{mg.L}^{-1}$  de  $\text{CuSO}_4$ )

As concentrações de cobre nos tanques foram medidas com o “Test 5-37” (Visocolor® ECO Kupfer), que é utilizado para a quantificação e controlo da quantidade de cobre presente na água dentro do intervalo entre 0 e 1,5 mg.L<sup>-1</sup> (ppm). Foram feitas medições diárias com o objectivo de verificar e garantir as concentrações de cobre na água.

No Ensaio 1, o período de exposição ao sulfato de cobre foi de 23 dias, com o objectivo de verificar a mortalidade, acumulação e alteração histopatológica provocadas a nível dos diferentes tecidos. No Ensaio 2, os peixes estiveram expostos durante 60 dias ao sulfato de cobre, com o objectivo de verificar se ocorre habituação (e consequentemente excreção de cobre pelo fígado), se surgem efeitos no comportamento e crescimento, e, ainda, outros parâmetros estudados no Ensaio 1.

No Ensaio 1, foram realizadas três amostragens, no dia 1, 16 e 23 da experiência. A primeira amostragem foi feita com 3 peixes, a segunda com 3, de cada tratamento, e na terceira amostragem foram retirados 5 peixes de cada tanque, ou seja 15 exemplares de cada tratamento. No Ensaio 2, foram realizadas cinco amostragens, nos dias 1, 15, 30, 45, 60 da experiência. A primeira amostragem foi feita com 6 exemplares, ou seja no ponto zero do Ensaio; a segunda e as amostragens seguintes foram efectuadas com 6 peixes de cada tanque ou seja, 18 exemplares de cada tratamento.

#### **5.4 Amostragem Biológica**

O primeiro passo dado após o peixe ter sido sacrificado, foi a medição do seu comprimento total, com um ictiómetro com precisão de 1 mm, e a pesagem do indivíduo numa balança com precisão de 0.01 g (figura 5). De seguida, retirou-se um arco branquial, o qual foi colocado num tubo “Normax” Neutro (z), para as análises histológicas. Nesse mesmo tubo, foram colocados parte do fígado e do intestino. No Ensaio 1, as amostras foram fixadas em *Bouin de Hollande*, durante 72 horas. Após a fixação, seguiu-se uma lavagem das peças em água corrente, durante 60 minutos. De seguida, as amostras foram adicionadas a álcool 70% até serem submetidas às técnicas histológicas, para posteriores análises. No Ensaio 2, às amostras para histologia adicionou-se formol 10% tamponado. O restante fígado foi colocado num *eppendorf* e colocado no congelador a -20°C para se proceder às análises químicas. O músculo foi retirado na totalidade e colocado num pedaço de alumínio que, posteriormente, foi colocado no congelador a -20°C.

O transporte das amostras, desde a Estação Piloto de Piscicultura de Olhão até à Faculdade de Medicina Veterinária, foi efectuado numa geleira e, também, à temperatura

ambiente, consoante seja para a análise toxicológica, permanecendo congeladas até ao local da análise, ou para histológica.

Figura 5 - Medição e pesagem de um indivíduo (*Diplodus sargus*)



### 5.5 Quantificação do cobre

Para a determinação de cobre no fígado, dadas as reduzidas dimensões dos organismos, optou-se por utilizar amostras constituídas por porções de fígado de 3 e 5 peixes, correspondentes à primeira e segunda amostragem do Ensaio 1, respectivamente, e de 2 peixes, correspondentes ao Ensaio 2. Para a determinação de cobre no músculo procedeu-se individualmente, no Ensaio 1, e aos pares, no Ensaio 2, tal como sucedeu com o fígado. As amostras foram descongeladas no frigorífico durante um período de aproximadamente 24 horas. Posteriormente, foram secas numa estufa à temperatura de 135°C, durante 2 horas. A digestão das amostras foi realizada pela via seca, à temperatura de 500°C, durante 12 horas. As amostras foram arrefecidas à temperatura ambiente e de seguida adicionou-se ácido nítrico 65%. Os cadinhos foram colocados numa placa eléctrica até o ácido evaporar. De seguida foram colocados numa mufla, durante 1 hora, a 500°C. Deixou-se arrefecer e repetiu-se o tratamento de adição de ácido, sempre que necessário.

O procedimento da quantificação de cobre foi efectuado de acordo com a técnica descrita em FP-5- Perkim Elmer. A quantificação foi realizada num espectrofotómetro de absorção atómica (Perkin Elmer, modelo Aanalyst 700). A leitura das soluções padrão e das soluções das amostras foi feito a 324,8 nm com uma lâmpada de cátodo oco, com chama ar/acetileno 10/2 (L/min). O limite de quantificação do método (LOD) é de 0,2 µg.mL<sup>-1</sup>. A leitura foi feita directamente a partir da curva de calibração (0,2 – 0,5 µg.mL<sup>-1</sup>). Os resultados foram expressos em µg de Cu g<sup>-1</sup> (Anexo A).

## 5.6 Procedimentos histológicos

Após a dissecação dos organismos, os tecidos removidos (peças histológicas) foram imediatamente fixados com um fixador de tecidos (solução de *Bouin de Hollande* ou em formol 10% tamponado). Esta fixação, para além de evitar a destruição das células pelas suas próprias enzimas ou por bactérias, visa também o endurecimento dos tecidos, tornando-os mais resistentes às etapas subsequentes da técnica histológica. Seguidamente, procedeu-se à desidratação através da passagem das peças por uma série crescente de álcoois (70°, 95° e 100°). Depois de desidratadas, as peças foram submetidas a três banhos de xilol, progressivamente mais puro (Anexo B). A impregnação foi efectuada após este tratamento, utilizando parafina fundida (58 – 60 °C), numa estufa Memmert (Alemanha, RFA). Para a inclusão das peças em parafina foram utilizados moldes de Leuckart, nos quais se colocou a parafina fundida, a identificação da amostra e a peça orientada favoravelmente ao corte. Os cortes foram efectuados com 5 µm de espessura, num micrótomo de Corredição Modelo Leica 5M 2000 R. Esses cortes foram colocados em banho-maria (20°C) e colocados em lâminas de vidro com uma solução de albumina e glicerina. A secagem foi efectuada numa estufa a 58°C, durante pelo menos 30 minutos.

Para a realização do exame histológico, procedeu-se à coloração dos cortes com o corante Hematoxilina-Eosina (H&E), de acordo com o descrito em Martoja e Martoja (1967) (Anexo B). Como resultado desta coloração os núcleos surgem em azul-violeta, o citoplasma celular em vermelho ou rosa, mais ou menos intenso, e as fibras elásticas a rosa vivo.

## 5.7 Análise de Crescimento

O crescimento foi verificado a partir do peso de cada peixe. Estas pesagens foram realizadas antes de os peixes serem colocados nos respectivos tanques e aquando de cada amostragem.



## 5.8 Análise Comportamental

O comportamento foi analisado a partir da quantidade de alimento consumido, verificado aquando do maneio alimentar, da posição que os indivíduos ocupam no tanque (comportamento natatório) e da cor que apresentam no momento da verificação, mais escura ou clara. A cor que o peixe apresenta pode ser indicadora de que este está confortável no seu meio ou de que está sob algum tipo de stress, o que se reflecte em tons de pele mais escuros (Figura 6). O comportamento alimentar foi verificado diariamente, a partir de medições regulares dos copos nos quais se encontrava o alimento e, foi expresso em g/peixe/dia. O comportamento natatório e a cor também foram verificados diariamente, sempre à mesma hora (14:15 horas), quando os peixes não estavam sob o stress do maneio dos tanques, efectuado de manhã e, sob o efeito do cobre que fora adicionado às 10:00 horas.

Figura 6 - Diferença de cor entre os sargos (*Diplodus sargus*) (clara versus escuro)



## 5.9 Análise estatística

Pretendeu-se apurar a existência de variações estatisticamente significativas na concentração de cobre em cada um dos órgãos estudados, fígado e músculo, de indivíduos expostos a tratamentos diferentes, ao longo de todo o ensaio. Assim, adoptou-se um Teste Paramétrico, a Análise Variância (one-way ANOVA e General Linear Model Univariate).

A análise de variância (ANOVA) é um procedimento estatístico normalmente usado para testar se duas ou mais médias amostrais poderão ter sido obtidas a partir de populações

com a mesma média paramétrica. A utilização desta análise permite testar se um grupo de médias pode ser considerado como amostras aleatórias de uma mesma população ou se existem evidências suficientes para concluir que os tratamentos que afectaram cada grupo separadamente modificaram suficientemente as médias, até não poderem mais ser consideradas amostras da mesma população.

Os pressupostos da ANOVA são os seguintes: as amostras são aleatórias e independentes, são retiradas de populações com distribuição normal e com a mesma variância (Zar, 1996).

A normalidade foi verificada utilizando o Teste de Shapiro-Wilk, e a homogeneidade de variâncias foi determinada pelo Teste de Levene.

Sempre que foram detectadas diferenças significativas entre as médias testadas ( $H_0$  rejeitada) utilizaram-se os testes de comparação múltipla (testes *a posteriori*). Após a aplicação da ANOVA, foi utilizado o Teste de Tukey HSD.

As médias calculadas são a melhor estimativa da média populacional mas têm associado um certo grau de imprecisão. O cálculo do intervalo de confiança para parâmetros normalmente distribuídos permite-nos exprimir a precisão da estimativa. O nível de significância considerado foi de 5% ( $\alpha=0,05$ ), em virtude do seu elevado grau de segurança, sendo este valor, de uma maneira geral e por convenção, normalmente atribuído para testes de hipóteses em ensaios científicos (Zar, 1996).

Todos os procedimentos estatísticos foram efectuados nos programas informáticos Microsoft Excel® e SPSS (Statistical Package for Social Sciences) v.15 para Windows software.

## 6. Resultados

A apresentação de resultados foi elaborada separadamente para cada uma das fases experimentais, assim como para cada ensaio, por se considerar que desta forma resulta mais clara a respectiva exposição. Assim, os resultados estão reagrupados em quatro secções no Ensaio 1 e em 6 secções no Ensaio 2.

O primeiro apresenta os resultados da qualidade da água onde se encontravam os peixes, assim como as concentrações de cobre presentes no meio. O segundo capítulo é referente à mortalidade ao longo do tempo que se desenrolou a experiência. O terceiro é relativo ao estudo de acumulação de cobre nos órgãos estudados. A repartição e localização do cobre dos tecidos do organismo assim como as lesões provocadas são objecto do quarto capítulo, no qual se apresentam os estudos histológicos. O quinto capítulo é alusivo às análises de crescimento dos peixes dos diferentes tratamentos e, por último, o sexto capítulo concerne à análise comportamental dos indivíduos expostos a diferentes concentrações de cobre.

### 6.1 Ensaio 1

#### 6.1.1 Qualidade da água

A temperatura da água, as percentagens de oxigénio dissolvido e o valor médio de cobre durante o decorrer do ensaio podem ser observadas na tabela 2. A salinidade manteve-se entre os 34 e 35 ‰.

Tabela 2- Temperatura, oxigénio dissolvido e concentração de cobre (média  $\pm \sigma$ ) observadas durante o decorrer do ensaio (23 dias)

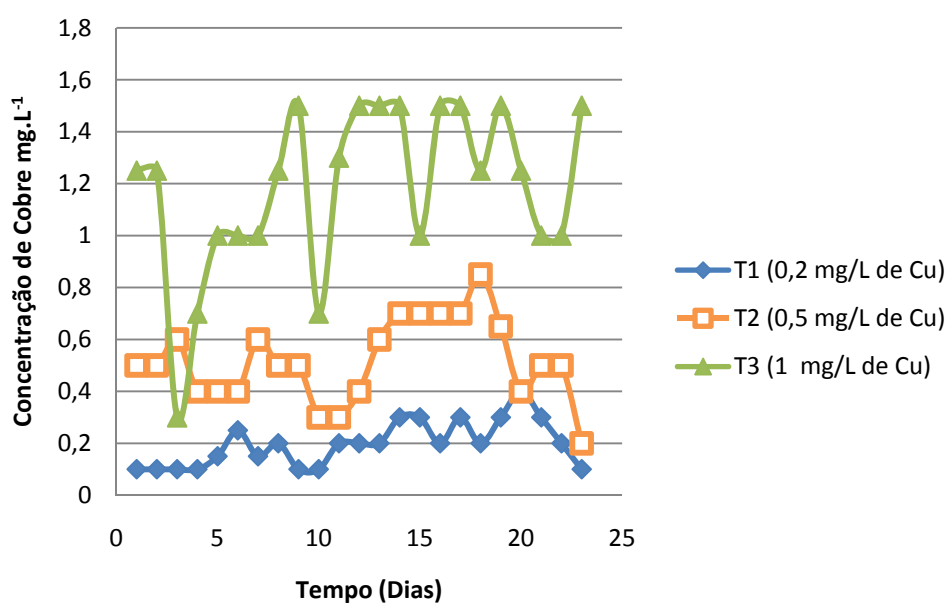
Tratamentos	Temperatura (°C)	Oxigénio (%)	Cobre (mg.L <sup>-1</sup> )
1	16,82 $\pm$ 0,90	89,39 $\pm$ 6,98	0,21 $\pm$ 0,11
2	16,75 $\pm$ 0,99	89,42 $\pm$ 7,35	0,52 $\pm$ 0,22
3	16,79 $\pm$ 0,97	89,43 $\pm$ 7,13	1,16 $\pm$ 0,35

Neste ensaio, não ocorreram alterações na qualidade física da água, entre os diferentes tratamentos e ao longo do tempo em que decorreu a experiência, que pudesse interferir nos resultados obtidos.

As oscilações verificadas no conteúdo de cobre na água são contempladas neste estudo devido à tentativa de recriação de condições o mais semelhantes possíveis com o que se pode observar nos tanques de piscicultura. Estas podem ser devidas à formação de complexos de cobre, descritos anteriormente.

No decorrer do Ensaio, observou-se uma grande oscilação nas medições de cobre, que estão representadas na figura 7.

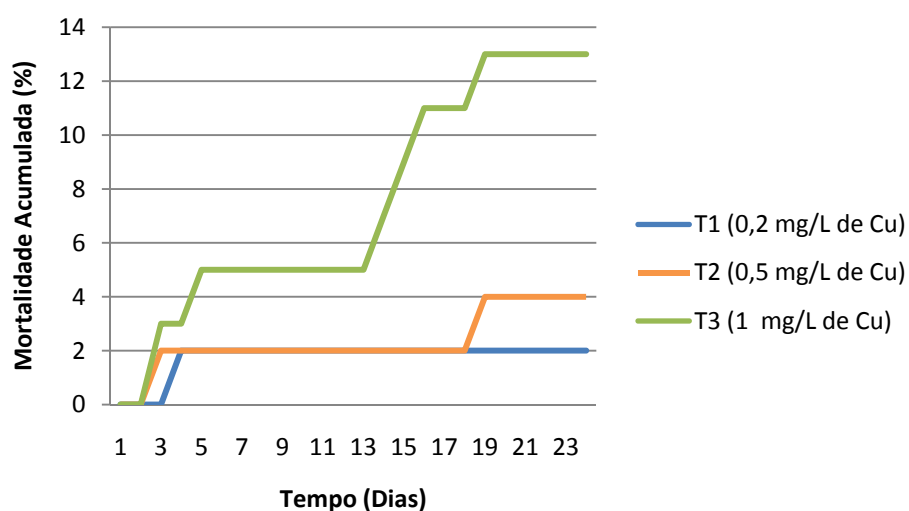
Figura 7 - Oscilações da concentração de cobre na água durante o período de exposição ao tratamento 1, 2 e 3.



### 6.1.2 Mortalidade

Ao longo do ensaio a mortalidade foi registada diariamente. Os resultados deste registo encontram-se descritos no gráfico da figura 8. Observou-se um aumento da taxa de mortalidade de acordo com a subida dos níveis da concentração de cobre na água durante o período de exposição.

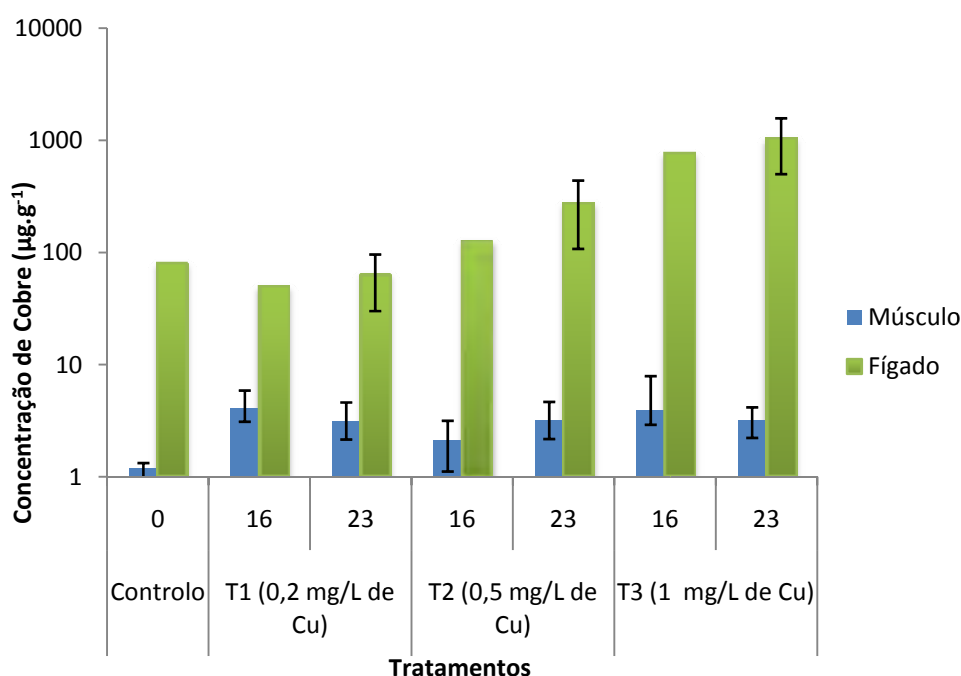
Figura 8 - Mortalidade acumulada dos juvenis *Diplodus sargus* expostos a diferentes concentrações de cobre ( $\text{Cu}^{2+}$ ) associado ao sulfato de cobre ( $\text{CuSO}_4$ ) durante o período em que decorreu o ensaio (1 a 23 dias)



### 6.1.3 Quantificação de Cobre

As concentrações de cobre obtidas a partir das análises toxicológicas foram visivelmente superiores no fígado comparativamente ao músculo, como se pode observar na figura 9. Ao longo do tempo, observa-se um aumento da concentração de cobre no fígado, assim como, quanto maior a quantidade de cobre na água maior a sua acumulação neste órgão. Relativamente ao músculo não se consegue observar nenhuma tendência com o decorrer do tempo, nem com o aumento da concentração de cobre na água.

Figura 9 - Concentração de cobre no músculo e no fígado dos juvenis *Diplodus sargus* aquando das amostragens (0; 16; 23 dias) nos diferentes tratamentos (controlo, 1, 2 e 3)



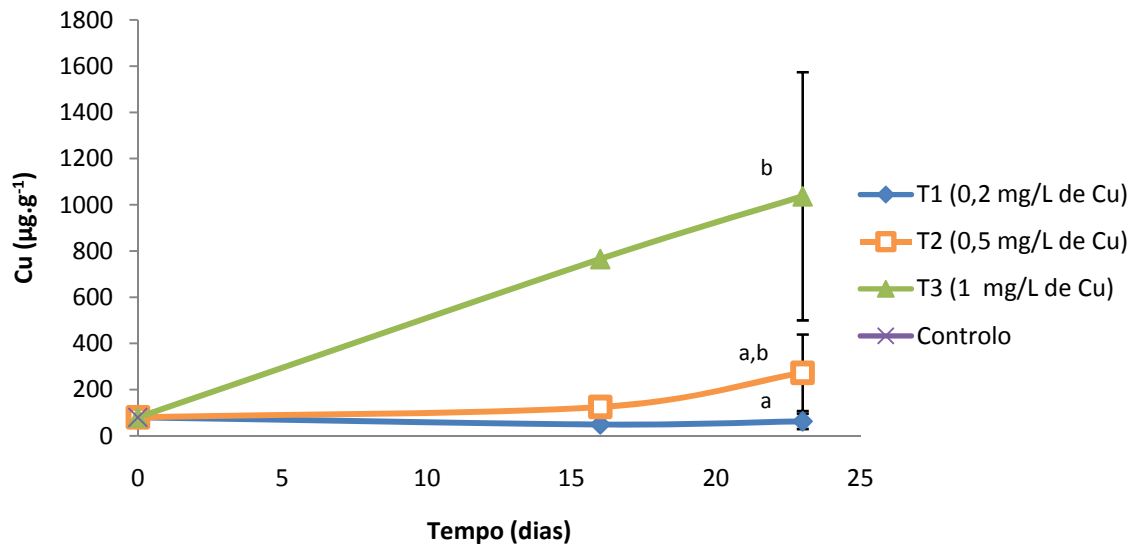
#### a) Fígado

A média das concentrações de cobre no fígado no início deste ensaio foi de 80,22 µg.g<sup>-1</sup> de peso seco.

No dia 16 desta experiência, as concentrações médias de cobre quantificadas no fígado dos peixes nos tratamentos 1, 2 e 3 foram 49,63, 125,4 e 765,4 µg.g<sup>-1</sup> de peso seco, respectivamente (Figura 10).

Relativamente ao dia 23 da experiência, as concentrações médias de cobre quantificadas no fígado dos peixes nos tratamentos 1, 2, e 3 foram 63,16, 273,3 e 1037,07 µg.g<sup>-1</sup> de peso seco, respectivamente (Figura 10).

Figura 10 - Concentração de cobre no fígado de *Diplodus sargus* no grupo de controlo, tratamento 1 (0,2 mg.L<sup>-1</sup> de Cu), tratamento 2 (0,5mg.L<sup>-1</sup> de Cu) e tratamento 3 (1 mg.L<sup>-1</sup> de Cu) durante o período de exposição ao CuSO<sub>4</sub> (1 a 23 dias). Os valores são as médias ± DP. Existem diferenças significativas entre os tratamentos se as letras forem diferentes.



A análise estatística da concentração de cobre determinada no fígado, efectuada através da Análise de Variância, revelou que existem diferenças estatisticamente significativas ( $p = 0,024$ ) entre os diferentes tratamentos, relativamente à última amostragem.

A comparação estatística (Teste de Tukey HSD) entre as concentrações de cobre determinadas no fígado revelou que não existem diferenças significativas entre os indivíduos do Tratamento 1 e do Tratamento 2, assim como nos do Tratamento 2 e do Tratamento 3, após 23 dias de exposição ao cobre ( $p > 0,05$ ). No entanto, verifica-se a existência de diferenças estatisticamente significativas entre os indivíduos do Tratamento 1 e os indivíduos expostos à maior concentração de cobre - Tratamento 3 - após os 23 dias em que decorreu o ensaio ( $p = 0,024$ ), ao qual apresentaram uma maior concentração de cobre no fígado.

Devido à falta de dados suficientes para proceder a um teste estatístico não foi possível determinar a existência de diferenças significativas entre os vários tratamentos e o grupo de controlo, na primeira amostragem do ensaio, assim como entre as duas amostragens realizadas ao longo desta experiência (Factor tempo,  $n < 3$ ).

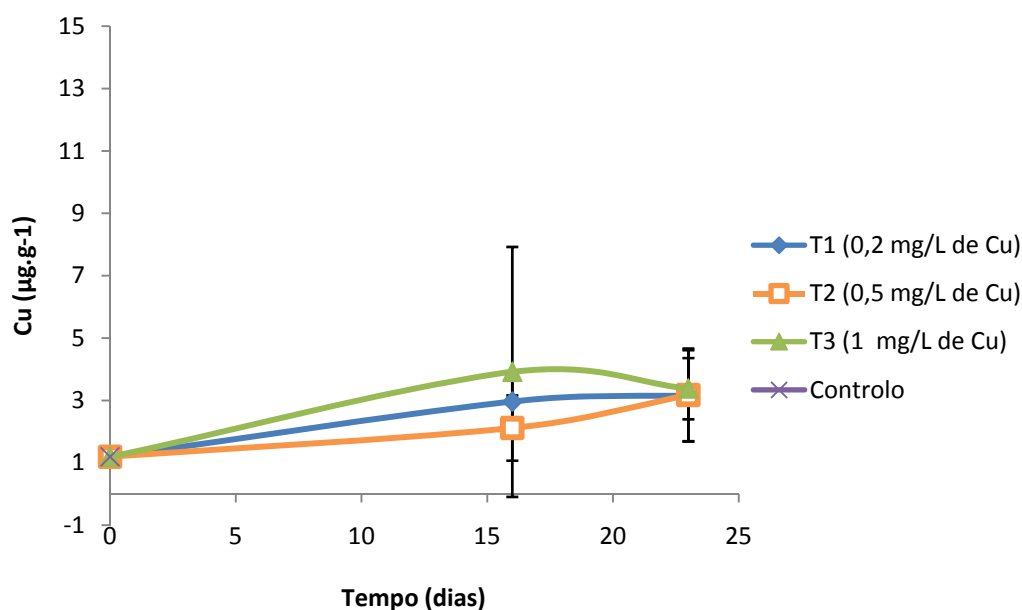
## b) Músculo

No início da experiência a média da concentração de cobre no músculo foi de  $1,19 \pm 0,14 \mu\text{g.g}^{-1}$  de peso seco.

No dia 16 desta experiência, as concentrações médias de cobre quantificadas no músculo dos peixes nos tratamentos 1, 2 e 3 foram  $2,96 \pm 0,78$ ,  $2,12 \pm 3,18$  e  $3,91 \pm 4,01 \mu\text{g.g}^{-1}$  de peso seco, respectivamente (Figura 11).

Relativamente ao dia 23 desta experiência, as concentrações médias de cobre quantificadas no músculo dos peixes nos tratamentos 1, 2 e 3 foram  $3,16 \pm 1,46$ ,  $3,18 \pm 1,49$  e  $3,39 \pm 0,98 \mu\text{g.g}^{-1}$  de peso seco, respectivamente (Figura 11).

Figura 11 - Concentração de cobre no músculo de *Diplodus sargus* no grupo de controlo, tratamento 1, 2 e 3 durante o período de exposição ao  $\text{CuSO}_4$  (1 a 23 dias). Os valores são as médias  $\pm$  D.P. (n = variável).



A análise estatística da concentração de cobre determinada no músculo, efectuada através da Análise de Variância, revelou que não existem diferenças significativas entre os tratamentos nas duas amostragens decorridas durante o ensaio ( $p = 0,613$  e  $p = 0,989$ , respectivamente).

Devido à insuficiência de dados para que se procedesse a uma análise estatística, não foi possível determinar a existência de diferenças significativas entre as duas amostragens sucedidas durante o ensaio (Factor tempo:  $n < 3$ ).



#### **6.1.4 Histologia**

No exame microscópico dos órgãos estudados, brânquias e fígado, detectaram-se alterações ao nível da estrutura do tecido branquial e hepático, entre os indivíduos controlo e os indivíduos expostos aos diferentes tratamentos.

O grau de alterações morfológicas observadas diferiu de acordo com o período de exposição e com o tratamento experimental. No entanto, foram também detectadas alterações de intensidade variável entre indivíduos expostos ao mesmo tratamento.

## a) Brânquias

Na tabela 3 apresentam-se os resultados das alterações morfológicas mais significativas ao nível branquial dos indivíduos expostos aos vários tratamentos durante o teste.

Tabela 3 – Alterações morfológicas das brânquias de *Diplodus sargus* ao longo do primeiro ensaio

Lesão	C	T 1 (0,2 mg.L <sup>-1</sup> )		T 2 (0,5 mg.L <sup>-1</sup> )		T 3 (1 mg.L <sup>-1</sup> )	
	Dia 0	16	23	16	23	16	23
Edema	0	0+	++	0+	++	+	++
Hiperplasia do epitélio branquial	0+	+	+	+	++	++	++
Hipertrofia do epitélio branquial	0+	0+	+	+	+	++	++
Fusão incompleta de várias lamelas	0	+	+	+	+	++	++
Fusão completa de várias lamelas	0	0+	+	0+	+	+	+
Necrose	0	0	0+	0	+	+	++
Congestão dos vasos sanguíneos	0	0+	0+	0+	+	0+	+

C – indivíduos controlo; T – tratamento; 0 ausente; 0+ pouco presente; + presente; ++ presente frequentemente

As alterações morfológicas observadas no tecido branquial dos indivíduos expostos a concentrações subletais de cobre consistem em hiperplasia, hipertrofia e edema, alterações ao nível das células, congestão dos vasos sanguíneos e necrose.

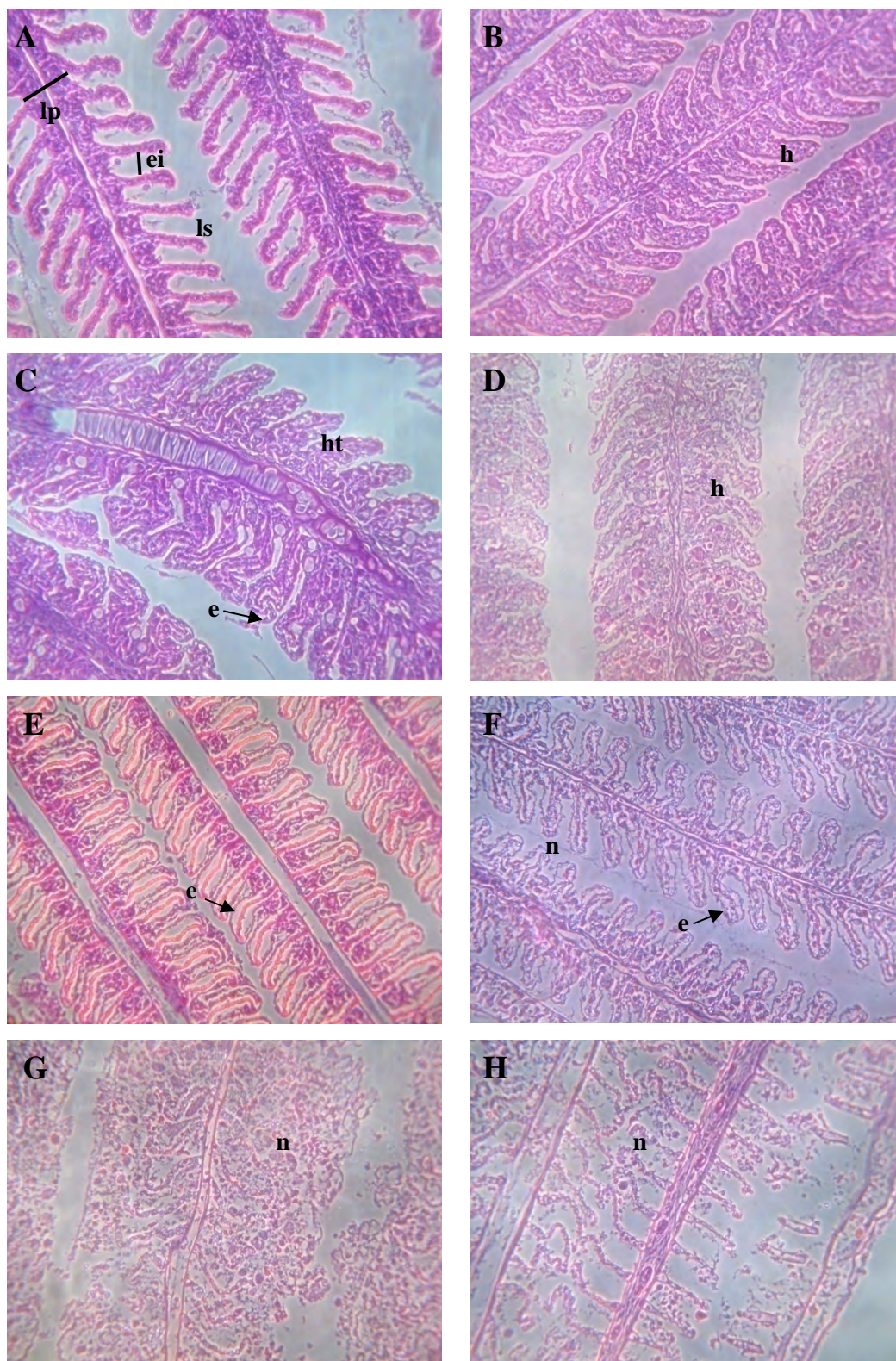
Nos indivíduos controlo, as brânquias apresentam uma estrutura normal com um evidente espaçamento interlamelar. As lamelas são bem diferenciadas e dispostas em ambos os lados do filamento branquial (Figura 12 A).

Após dezasseis dias de exposição ao cobre, em todas as concentrações (0,2, 0,5 e 1 mg.L<sup>-1</sup>), observou-se hiperplasia e hipertrofia do epitélio branquial, com maior incidência e mais evidenciado no tratamento que continha maior concentração de cobre (Figura 12 D). Foi

ainda detectado uma ligeira necrose nos indivíduos expostos a uma maior concentração de cobre. As alterações verificadas nas brânquias aumentaram com a concentração, verificando-se os casos mais acentuados, nomeadamente a fusão completa de várias lamelas branquiais, nos indivíduos expostos à concentração de 1 mg.L<sup>-1</sup>.

Decorridos vinte e três dias de exposição ao cobre as alterações morfológicas permitem salientar lesões mais evidentes em cada uma das concentrações utilizadas, com particular evidência para a maior concentração em que se verificou o completo intumescimento do espaço interlamelar, com consequente fusão completa de todas as lamelas branquiais, com numerosas zonas de necrose (Figura 12 G e H). Ao nível do epitélio foi possível verificar edema com a concentração de 0,2 mg.L<sup>-1</sup> (Figura 12 E).

Figura 12 - Secções histológicas representativas das brânquias de *Diplodus sargus*



A: brânquia de um organismo controlo; estrutura normal. B: ( $0,2 \text{ mg.L}^{-1}$ ; 16 dias) estrutura branquial evidenciando a proliferação das células epiteliais na base do espaço interlamelar (setas). C: ( $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$ ; 16 dias) hipertrofia das lamelas branquiais. D: ( $1 \text{ mg.L}^{-1}$ ; 16 dias) hiperplasia evidente; lamelas menos identificáveis. E: ( $0,2 \text{ mg.L}^{-1}$ ; 23 dias) separação do epitélio respiratório (edema). F: ( $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$ ; 23 dias) hiperplasia notória; fusão incompleta de várias lamelas branquiais. G: ( $1 \text{ mg.L}^{-1}$ ; 23 dias)

necrose. H: (1 mg.L<sup>-1</sup>; 23 dias) zonas totais de necrose. lp, lamela primária branquial; ls, lamela secundária branquial; ei, espaço interlamelar; h, hiperplasia; ht, hipertrofia; e, edema; n, necrose. Coloração H&E. Ampliação 400×.

## **b) Fígado**

Com base nas observações, efectuadas ao microscópio, do fígado, verifica-se que, comparativamente aos indivíduos controlo, os indivíduos expostos às concentrações subletais de cobre de 0,2, 0,5 e 1 mg.L<sup>-1</sup> apresentam alterações no parênquima hepático (Figura 13).

Nos indivíduos controlo, o fígado apresenta uma estrutura normal: um parênquima hepático homogêneo, constituído por um sistema de hepatócitos de forma poliédrica bem definida e sustentado por uma rede de sinusóides. Os hepatócitos apresentam aumento de volume com ligeira esteatose (Figura 13 A).

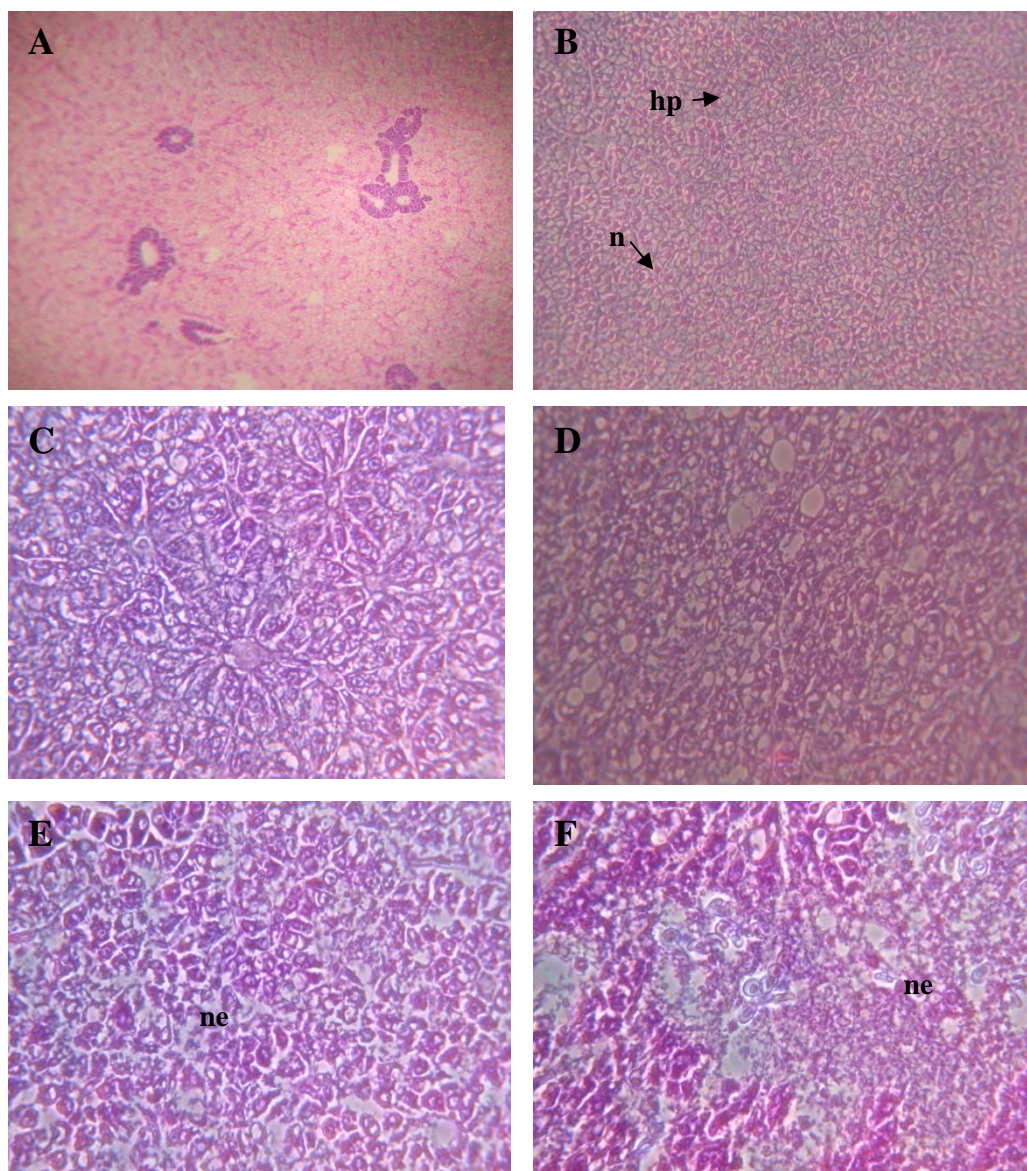
Nos indivíduos expostos às várias concentrações de cobre encontraram-se alterações ao nível da organização dos hepatócitos, que consistem essencialmente num aumento celular dos hepatócitos, com degenerescência e focos de necrose (Figura 13 C-F).

De um modo geral, verificou-se que a degenerescência e a perda de integridade do tecido hepático se acentuaram com o aumento da concentração e com o período de exposição resultando em necrose, pelo que se considerou útil o estabelecimento de uma escala de alteração do tecido hepático. A escala é composta por 3 níveis de alteração. O nível 1 indica a ausência de alterações com a presença de ligeira esteatose; no nível 2 consideram-se os indivíduos onde se observa degenerescência celular com a presença de focos de hepatócitos com grandes espaços vazios no citoplasma; o nível 3 corresponde aos indivíduos onde se observa necrose celular.

Após observação, os cortes histológicos do fígado foram classificados de acordo com os diferentes níveis de alteração considerados anteriormente (Figura 14).

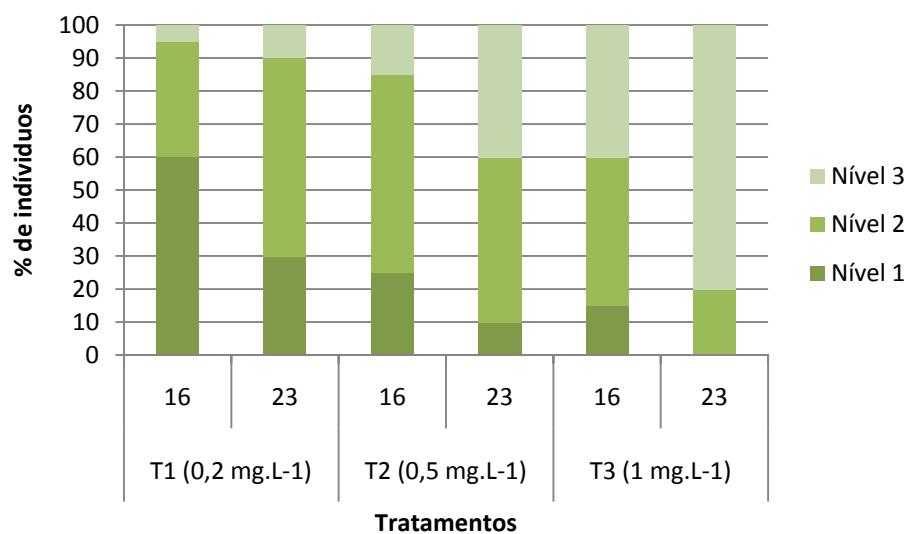


Figura 13 – Secções histológicas representativas do fígado de *Diplodus sargus*



A: fígado de um organismo controlo; estrutura hepática normal, nível de alteração 1. B – F: fígado de organismos expostos a concentrações subletais de cobre ( $0,2 \text{ mg.L}^{-1}$ ;  $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$ ;  $1 \text{ mg.L}^{-1}$ ). B: nível de alteração 1 ( $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$ , 16 dias de exposição). C: nível de alteração 2 ( $0,2 \text{ mg.L}^{-1}$ , 23 dias de exposição). D: nível de alteração 2 ( $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$ , 23 dias de exposição). E, F: nível de alteração 3 ( $1 \text{ mg.L}^{-1}$ ; 23 dias de exposição). hp, hepatócito; n, núcleo; ne, necrose. Coloração H&E. A-B: Ampliação 200x. C-F: Ampliação 400x.

Figura 14 - Distribuição, em percentagem, dos organismos (*Diplodus sargus*) expostos a concentrações subletais de cobre, pelos diferentes níveis de alteração do tecido hepático



## 6.2 Ensaio 2

Neste segundo ensaio, com as concentrações definidas, o objectivo foi prolongar o tempo de exposição ao sulfato de cobre (60 dias) e estudar quais os possíveis efeitos no organismo dos juvenis de sargo utilizados nesta experiência. Como tal, controlou-se os parâmetros da qualidade da água, procedeu-se à análise da mortalidade durante o decorrer do ensaio, analisou-se a acumulação de cobre no músculo e no fígado, estudou-se os efeitos morfológicos nas brânquias, no fígado e intestino, avaliou-se a ocorrência ou não de crescimento durante o ensaio e averiguou-se a existência de mudanças comportamentais entre os animais expostos ao sulfato de cobre e os animais controlo, a partir do comportamento alimentar, natatório e pela cor apresentada por cada indivíduo.

### 6.2.1 Qualidade da água

Os parâmetros bióticos da qualidade da água, tais como a temperatura, e a percentagem de oxigénio dissolvido, em cada tratamento, assim como os parâmetros químicos, o valor médio de cobre presente na água durante o ensaio, estão descritos na tabela 4. A salinidade manteve-se entre os 34 e 35‰.

Tabela 4 - Temperatura, oxigénio dissolvido e concentração de cobre (média  $\pm \sigma$ ) observados durante o ensaio (60 dias)

Tratamentos	Temperatura (°C)	Oxigénio (%)	Cobre (mg.L <sup>-1</sup> )
Controlo	19,3 $\pm$ 1,602	80,8 $\pm$ 8,204	0 $\pm$ 0
1	19,2 $\pm$ 1,641	84,5 $\pm$ 7,824	0,1 $\pm$ 0,048
2	19,3 $\pm$ 1,626	83,6 $\pm$ 5,712	0,2 $\pm$ 0,070

Neste ensaio, não foram verificadas alterações na variável física da água, entre os diferentes tratamentos e ao longo do tempo, que pudessem interferir nos resultados obtidos.

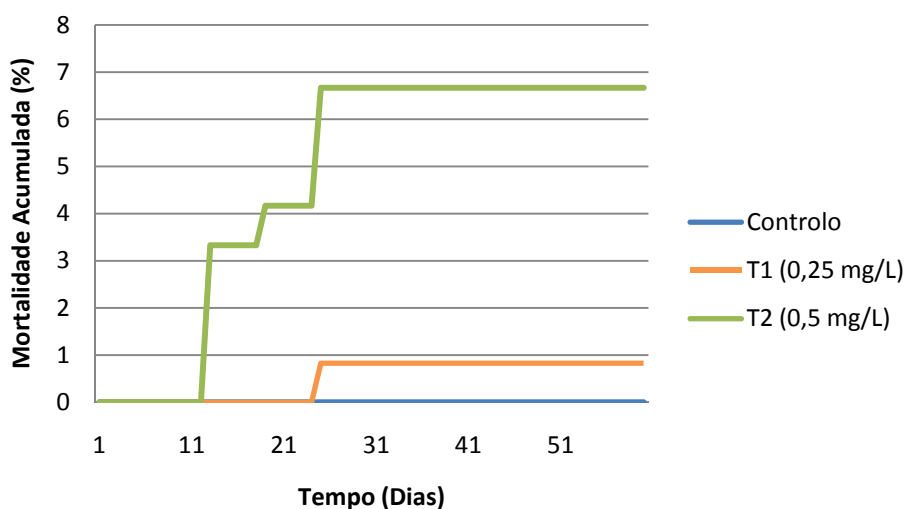
As oscilações de cobre na água também foram contempladas neste ensaio, verificando-se um menor desvio padrão comparativamente ao ensaio anterior, ou seja, um menor desvio dos resultados em relação à sua média. Assim, como já referido anteriormente, tais oscilações são prováveis de ocorrer num ambiente tido como normal num tanque de piscicultura devido à formação de complexos de cobre.



### 6.2.2 Mortalidade

Ao longo deste ensaio a mortalidade foi registada diariamente; os seus resultados encontram-se descritos no gráfico da figura 15.

Figura 15 - Mortalidade acumulada dos juvenis de *Diplodus sargus* expostos a diferentes concentrações de cobre ( $\text{Cu}^{2+}$ ) associado ao sulfato de cobre ( $\text{CuSO}_4$ ) durante o período em que decorreu o ensaio (60 dias)

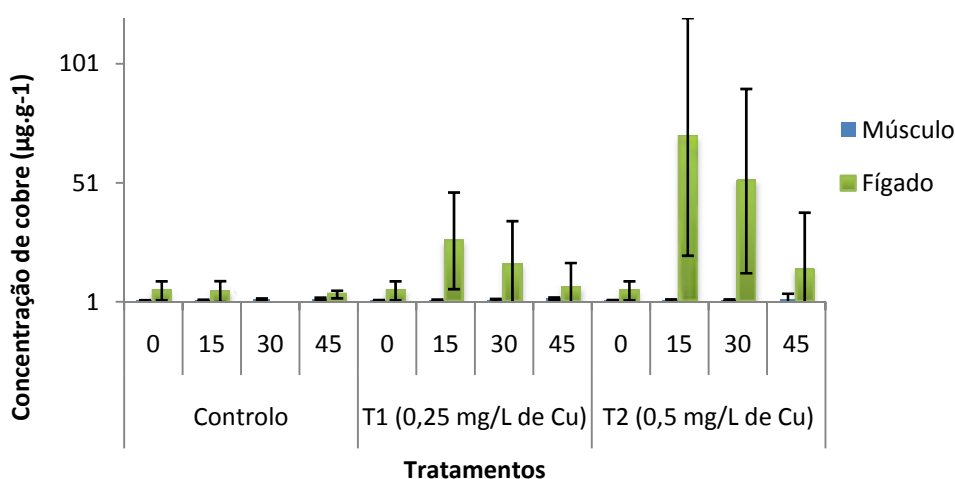


Com o decorrer do ensaio, registou-se um aumento de mortalidade de acordo com o aumento do nível de concentração de cobre na água, atingindo um valor máximo da mortalidade (6,67%) nos peixes expostos a  $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$  de cobre. A partir do vigésimo quinto dia a mortalidade estagnou, mantendo-se esse valor até ao final do ensaio (sexagésimo dia).

### 6.2.3 Quantificação de Cobre

As concentrações de cobre obtidas a partir das análises toxicológicas foram notavelmente superiores no fígado comparativamente às do músculo, como se pode observar no gráfico da figura 16. Comparando os grupos tratados com os grupos de controlo consegue-se observar uma maior acumulação de cobre no fígado no tratamento 2 (0,5 mg.L<sup>-1</sup>), sucedendo um aumento da sua concentração até aos quinze dias de exposição verificando-se de seguida um decréscimo. Pela observação da figura 16 podemos definir que a concentração de cobre no músculo tem tendência a aumentar ligeiramente com o decorrer do ensaio.

Figura 16 - Concentração de cobre no músculo e no fígado dos juvenis *Diplodus sargus* aquando das amostragens (0; 15; 30; 45 dias) nos diferentes tratamentos (controlo, 1 e 2)



#### a) Fígado

A média das concentrações de cobre no fígado no início deste ensaio foi de  $5,60 \pm 3,99 \mu\text{g.g}^{-1}$  de peso seco (Figura 17).

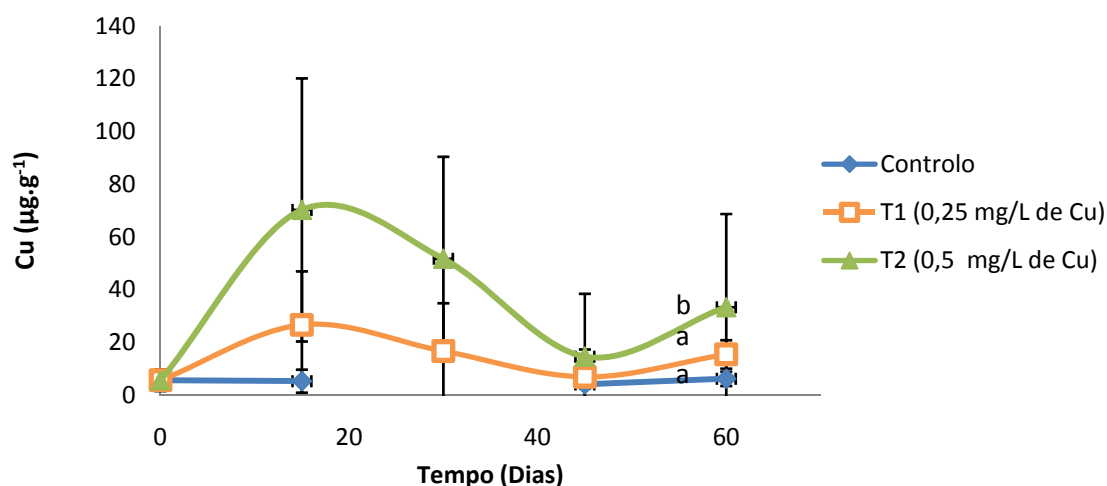
No dia 15 desta experiência, as concentrações médias de cobre quantificadas no fígado dos peixes no controlo e nos tratamentos 1 e 2 foram  $5,30 \pm 4,38$ ,  $26,63 \pm 20,30$  e  $70,25 \pm 49,91 \mu\text{g.g}^{-1}$  de peso seco, respectivamente (Figura 17).

Relativamente ao dia 30 da experiência não foi possível quantificar a concentração de cobre do grupo controlo devido ao facto de a quantidade de amostra se ter mostrado insuficiente para a metodologia analítica disponível, sendo as concentrações médias de cobre obtidas no fígado dos peixes nos tratamentos 1 e 2 de  $16,63 \pm 18,24$  e  $51,71 \pm 38,71 \mu\text{g.g}^{-1}$  de peso seco, respectivamente (Figura 17).

No dia 45 desta experiência, as concentrações médias de cobre quantificadas no fígado dos peixes no grupo controlo e nos tratamentos 1 e 2 foram  $4,08 \pm 1,60$ ,  $6,86 \pm 10,44$  e  $14,59 \pm 23,84 \mu\text{g.g}^{-1}$  de peso seco, respectivamente (Figura 17).

Decorridos 60 dias de experiência, as concentrações médias obtidas a partir da análise toxicológica foram de  $6,2 \pm 2,71 \mu\text{g.g}^{-1}$  de peso seco para o grupo controlo, e de  $15,44 \pm 5,37$  e  $33,35 \pm 35,34 \mu\text{g.g}^{-1}$  de peso seco para o tratamento 1 e 2, respectivamente (Figura 17).

Figura 17 - Concentração de cobre no fígado de *Diplodus sargus* no grupo de controlo, tratamento 1 ( $0,25 \text{ mg.L}^{-1}$  de Cu) e tratamento 2 ( $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$  de Cu) durante o período de exposição ao  $\text{CuSO}_4$  (1 a 60 dias). Os valores são as médias  $\pm$  D.P. ( $n = 9$ ). Existem diferenças significativas entre os tratamentos se as letras forem diferentes ( $p < 0,05$ )



A análise estatística da concentração de cobre determinada no fígado, efectuada através da ANOVA a dois factores (dias de amostragem e tratamentos) revelou a existência de diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ) entre os diferentes dias de amostragens e os diferentes tratamentos.

A comparação estatística (Teste de Tukey HSD) entre as concentrações de cobre determinadas no fígado mostrou que não existem diferenças estatisticamente significativas entre os indivíduos do grupo controlo e do tratamento 1 ( $p > 0,05$ ) durante o tempo em que decorreu o ensaio. No entanto, verificou-se a existência de diferenças significativas entre o grupo controlo e o grupo com a maior concentração de cobre, tratamento 2, ( $p < 0,05$ ) e entre os tratamentos 1 e 2 ( $p < 0,05$ ), sendo os indivíduos do tratamento 2 os que apresentam maior concentração de cobre no fígado durante o ensaio.

Relativamente aos dias de amostragem, a comparação estatística (Teste de Tukey HSD) entre as concentrações apuradas no fígado indica a existência de diferenças estatisticamente significativas entre a amostragem do dia 15 e do dia 45 ( $p=0,001$ ), do dia 15 e 60 ( $p=0,013$ ) e entre o dia 30 e 45 ( $p=0,011$ ) de amostragem. Não foi possível determinar a existência de diferenças significativas entre o início do ensaio (dia 0) e os outros dias de amostragem pela insuficiência de dados para que se procedesse a um teste estatístico ( $n < 3$ ). Posto isto, verificou-se qual (ais) o (s) grupo (s) (controlo, tratamento 1 ou 2) que diferia (iam) estatisticamente durante o decorrer do ensaio o que permitiu saber que o grupo controlo e o tratamento 2 não são significativamente diferentes ( $p=0,379$  e  $p=0,07$ , respectivamente) aquando de cada amostragem, e que o tratamento 1 apresentou diferenças significativas ( $p=0,047$ ), mais concretamente entre a amostragem do dia 15 e do dia 45 ( $p=0,042$ ).

## **b) Músculo**

Quando se iniciou este ensaio, a média da concentração de cobre obtida para o músculo foi de  $1,59 \pm 0,1 \mu\text{g.g}^{-1}$  de peso seco (Figura 18).

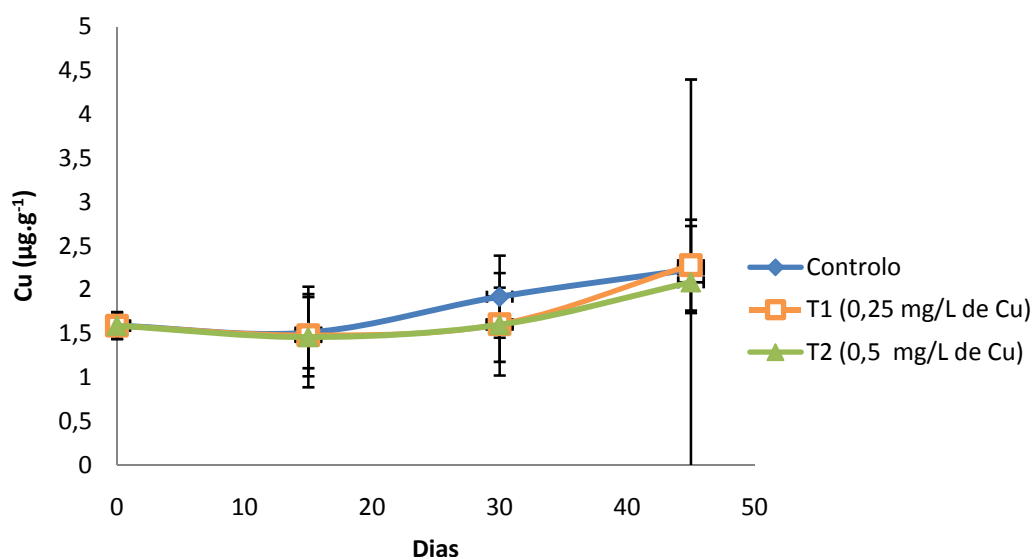
No dia 15 desta experiência, as concentrações médias de cobre quantificadas no músculo dos peixes do grupo controlo, tratamentos 1 e 2 foram  $1,51 \pm 0,41$ ,  $1,48 \pm 0,47$  e  $1,46 \pm 0,57 \mu\text{g.g}^{-1}$  de peso seco, respectivamente (Figura 18).

No trigésimo dia do ensaio, as concentrações médias de cobre obtidas no músculo dos peixes do grupo controlo, tratamentos 1 e 2, foram de  $1,92 \pm 0,47$ ,  $1,61 \pm 0,58$  e  $1,6 \pm 0,42 \mu\text{g.g}^{-1}$  de peso seco, respectivamente (Figura 18).

Relativamente ao dia 45 desta experiência, as concentrações médias de cobre quantificadas no músculo dos peixes no grupo controlo, tratamentos 1 e 2 foram  $2,23 \pm 0,49$ ,  $2,28 \pm 0,52$  e  $2,09 \pm 2,31 \mu\text{g.g}^{-1}$  de peso seco, respectivamente (Figura 18).

Devido a problemas técnicos na preparação da amostra de músculo do sexagésimo dia do ensaio, não foi possível realizar a quantificação de cobre nessas amostras, não se podendo proceder à sua análise.

Figura 18 - Concentração de cobre no músculo de *Diplodus sargus* no grupo de controlo, tratamento 1 e 2 durante o período de exposição ao  $\text{CuSO}_4$  (60 dias). Os valores são as médias  $\pm$  D.P. (n=9)



A análise estatística da concentração de cobre determinada no músculo, efectuada a partir da ANOVA a dois factores (dias de amostragem e tratamentos) revelou que não existem diferenças significativas entre o grupo controlo e os dois tratamentos, nem entre os tratamentos ( $p=0,544$ ).

#### 6.2.4 Histologia

Neste ensaio, a observação microscópica, para além de ter sido efectuada nas brânquias e no fígado, como no primeiro ensaio, foi também executada no intestino, entre os indivíduos controlo e os indivíduos expostos aos dois tratamentos (tratamento 1:  $0,25 \text{ mg.L}^{-1}$  de Cu; tratamento 2:  $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$  de Cu).

Verifica-se novamente que o grau de alterações morfológicas observadas diferiu de acordo com o período de exposição e com o tratamento experimental, assim como foram, igualmente, detectadas alterações de intensidade variável entre os indivíduos expostos ao mesmo tratamento. Estas lesões, individualmente ou em conjunto, num mesmo indivíduo podiam não ser extensivas a toda a estrutura branquial, evidenciando-se, a sua maioria, mais severas do meio à extremidade das lamelas primárias.

Relativamente ao intestino, não são visíveis alterações morfológicas ao nível do tecido em nenhum dos tratamentos, comparativamente ao de controlo.

### a) Brânquias

Na tabela 5 estão representados os resultados das alterações morfológicas mais significativas ao nível branquial, dos indivíduos expostos aos vários tratamentos durante o decorrer do ensaio.

Tabela 5 – Alterações morfológicas das brânquias de *Diplodus sargus* durante o segundo ensaio

Lesão	C		T 1 (0,25 mg.L <sup>-1</sup> )				T 2 (0,5 mg.L <sup>-1</sup> )			
	Dia	0	15	30	45	60	15	30	45	60
Edema		0	+	+	+	+	++	++	++	++
Hiperplasia do epitélio branquial		0+	+	+	+	+	+	+	++	+
Hipertrofia do epitélio branquial		0	0+	+	+	+	0+	+	+	+
Fusão incompleta de várias lamelas		0	0	0+	0+	+	+	+	++	++
Fusão completa de várias lamelas		0	0	0+	0+	+	0	0+	+	+
Necrose		0	0	0	0	0+	0	0+	+	+
Congestão dos vasos sanguíneos		0	0+	+	+	+	0+	+	+	+

C – indivíduos controlo; T – tratamento; 0 ausente; 0+ pouco presente; + presente; ++ presente frequentemente

Neste ensaio, as alterações morfológicas observadas no tecido branquial dos indivíduos expostos a concentrações de cobre consistem em edema, hiperplasia, hipertrofia, alterações ao nível das células e dos vasos sanguíneos e necrose.

Nos indivíduos controlo, tal como no ensaio 1, as brânquias apresentam uma estrutura normal, com um evidente espaçamento interlamelar. As lamelas são bem diferenciadas e dispostas em ambos os lados do filamento branquial (Figura 19 e 20 A).

Após quinze dias de exposição ao cobre em ambas as concentrações utilizadas, 0,25 e 0,5 mg.L<sup>-1</sup>, observou-se frequentemente edema, alguma hiperplasia das células epiteliais na

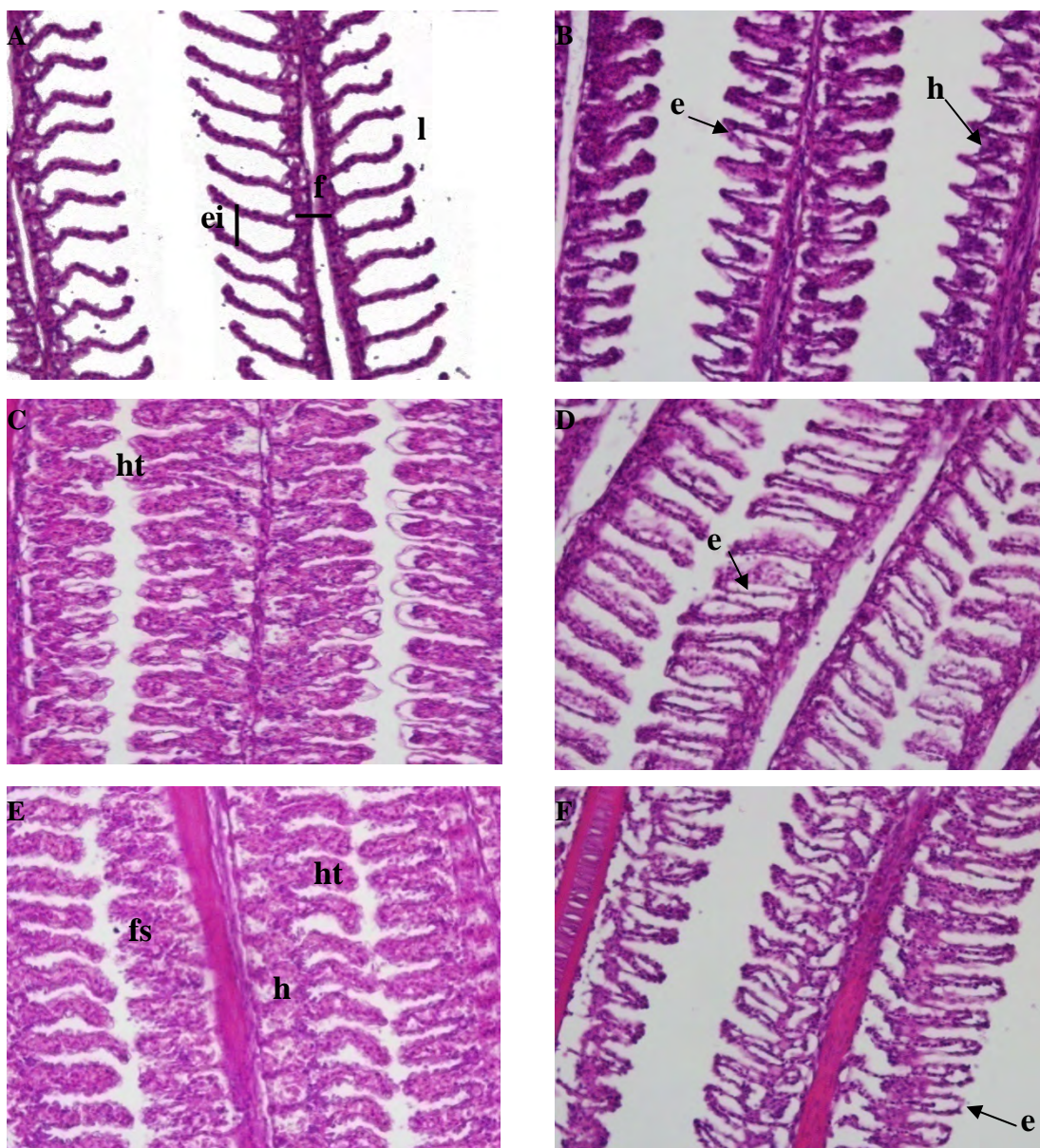
base das lamelas secundárias e uma ligeira hipertrofia ao nível das mesmas (Figura 19 B e 20 G).

Ao fim de trinta dias de exposição ao cobre, a observação microscópica permite observar hiperplasia nos espaços interlamelares, conduzindo à fusão de lamelas secundárias adjacentes. As lesões apresentam-se de forma mais acentuada em cada uma das concentrações, comparando com os cortes histológicos do quinquagésimo dia de exposição, assim como um edema mais definido e aumento da frequência de hipertrofia nos tecidos branquiais (Figura 19 C e 20 H). Estas lesões são mais evidentes e frequentes nos indivíduos expostos a maiores concentrações de cobre.

Após quarenta e cinco dias de exposição ao cobre, não se verificou uma alteração significativa no tratamento que continha  $0,25 \text{ mg.L}^{-1}$  de Cu desde a última amostragem (30 dias) relativamente às diversas lesões do tecido branquial (Figura 19 D). Nos peixes submetidos ao tratamento com maior concentração de cobre pode-se observar uma frequente presença de hiperplasia conduzindo à fusão incompleta e/ou completa de algumas lamelas secundárias, edema bem evidenciado, e algumas zonas de necrose (Figura 20 I).

Na última amostragem deste ensaio, após 60 dias de exposição ao cobre, não são registadas alterações morfológicas ao nível do tecido branquial que diferissem evidentemente da amostragem anterior referente ao tratamento com menor concentração de cobre, podendo observar-se uma fusão de lamelas secundárias adjacentes, separação do epitélio branquial e denotando-se o aparecimento pontual de zonas de necrose (Figura 19 E e F). No tratamento com  $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$  de cobre continuou a observar-se, em alguns peixes, hiperplasia, hipertrofia, edema, zonas de necrose e uma maior congestão dos vasos sanguíneos (Figura 20 J e K). Neste grupo observaram-se indivíduos com lesões menos graves comparativamente com o grupo de amostragem anterior, sugerindo a possibilidade de adaptação ao tratamento.

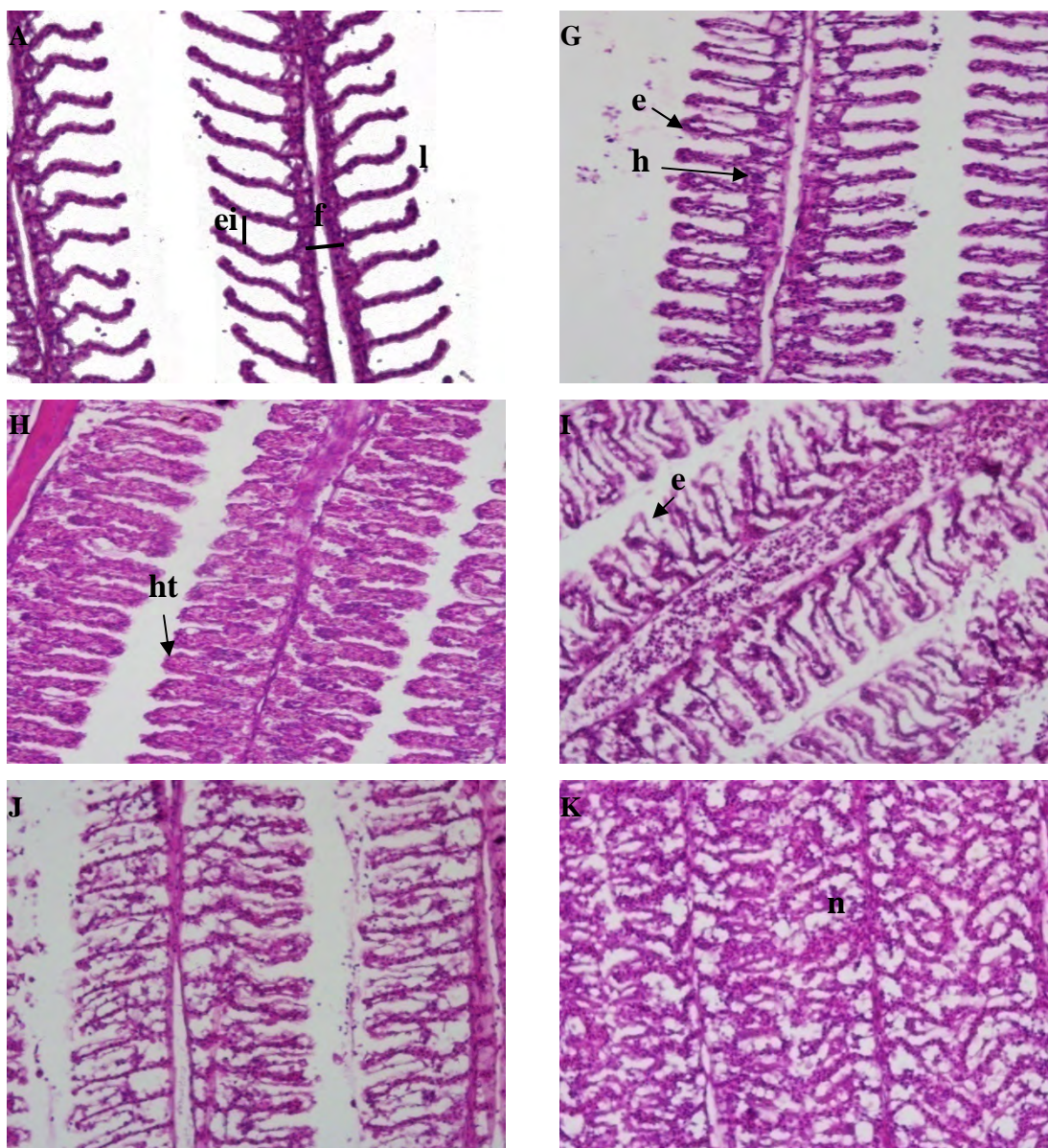
Figura 19 - Secções histológicas representativas das brânquias de *Diplodus sargus* referentes ao tratamento 1 (0,25 mg.L<sup>-1</sup>) durante o decorrer do ensaio (60 dias)



A: brânquia de um organismo controlo; estrutura normal. B: (15 dias de tratamento) estrutura branquial evidenciando edema e hiperplasia na base das lamelas secundárias (h). C: (30 dias de tratamento) edema e hipertrofia das lamelas secundárias. D: (45 dias de tratamento) edema nas lamelas secundárias da estrutura branquial. E e F: (60 dias de tratamento) hiperplasia; hipertrofia; fusão de lamelas secundárias adjacentes; separação do tecido epitelial. f, filamento branquial; l, lamela branquial; ei, espaço interlamelar; h, hiperplasia; ht, hipertrofia; fs, fusão das lamelas secundárias; e, edema. Coloração H&E. Ampliação 400×.



Figura 20 - Secções histológicas representativas das brânquias de *Diplodus sargus* referentes ao tratamento 2 (0,5 mg.L<sup>-1</sup>) durante o decorrer do ensaio (60 dias).



A: brânquia de um organismo controlo; estrutura normal. G: (15 dias de tratamento) edema evidente; hiperplasia na base das lamelas secundárias. H: (30 dias de tratamento) hiperplasia nos espaços interlamelares, conduzindo à fusão de lamelas secundárias adjacentes; hipertrofia. I: (45 dias de tratamento) separação completa do tecido epitelial da lamela secundária. J e K: (60 dias de tratamento) edema; necrose bem demarcada. f, filamento branquial; l, lamela branquial; ei, espaço interlamelar; h, hiperplasia; ht, hipertrofia; e, edema; n, necrose. Coloração H&E. Ampliação 400×

## **b) Fígado**

Com base no estudo das alterações morfológicas efectuado nos cortes histológicos do fígado verificou-se que os indivíduos expostos às concentrações de cobre, 0,25 e 0,5 mg.L<sup>-1</sup>, apresentam alterações no parênquima hepático (Figura 21 e 22).

Nos indivíduos controlo, o fígado apresenta uma estrutura normal, apresentando por vezes uma ligeira esteatose (Figura 21 e 22 A).

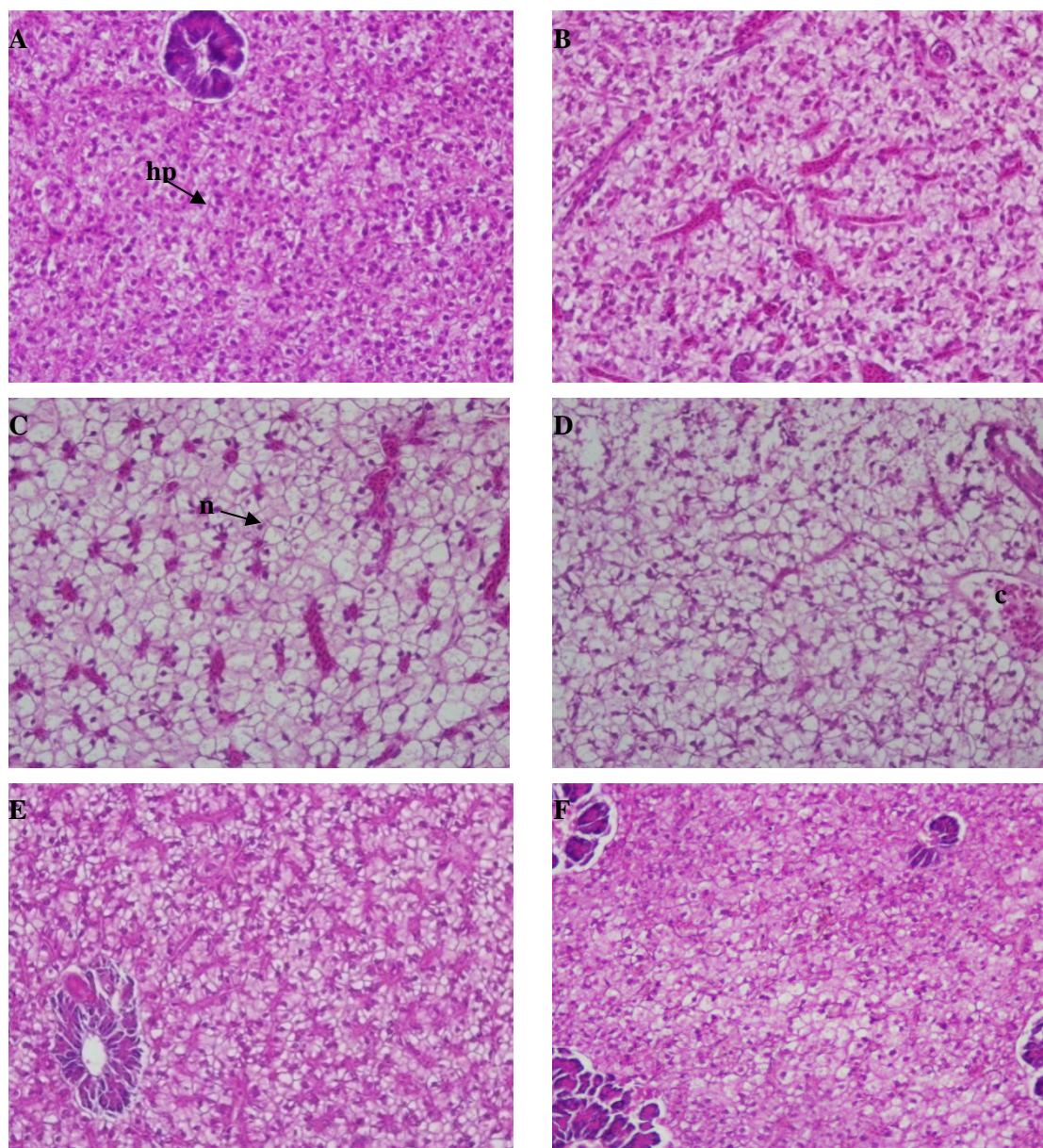
No fígado dos indivíduos expostos às concentrações de cobre, 0,25 e 0,5 mg.L<sup>-1</sup>, observam-se focos com um aumento celular dos hepatócitos com espaços vazios, congestão vascular, edema e necrose celular (Figura 21 e 22).

De um modo geral, verificou-se que as lesões provocadas no fígado se acentuavam com o aumento do período de exposição, demonstrando-se mais graves nos indivíduos expostos ao tratamento de maior concentração de cobre (0,5 mg.L<sup>-1</sup>), resultando, por vezes, em necrose celular (Figura 22 K).

As alterações microscópicas observadas no fígado foram classificadas em diferentes níveis, tal como descrito na página 40 (Figura 23).



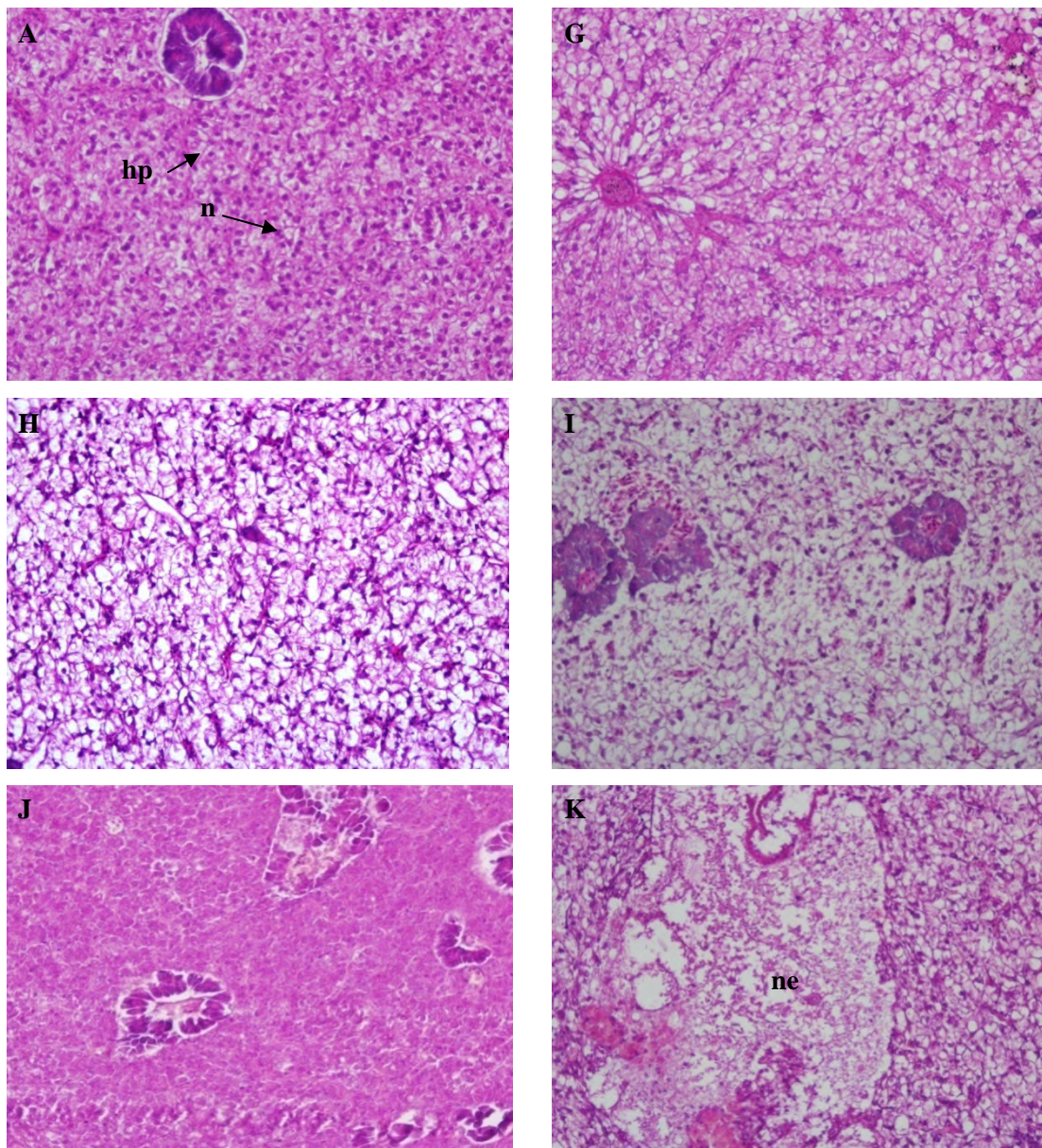
Figura 21 - Secções histológicas do fígado de *Diplodus sargus* expostos a 0,25 mg.L<sup>-1</sup> de cobre (Tratamento 1) durante o decorrer do ensaio (60 dias).



A: fígado de um organismo controlo; estrutura hepática normal, nível de alteração 1. B: (15 dias de tratamento) nível de alteração 1; C: (30 dias de tratamento) nível de alteração 2; D: (45 dias de tratamento) nível de alteração 2; E e F: (60 dias de tratamento) nível de alteração 2. hp, hepatócito; n, núcleo. Coloração H&E. Ampliação 400×.

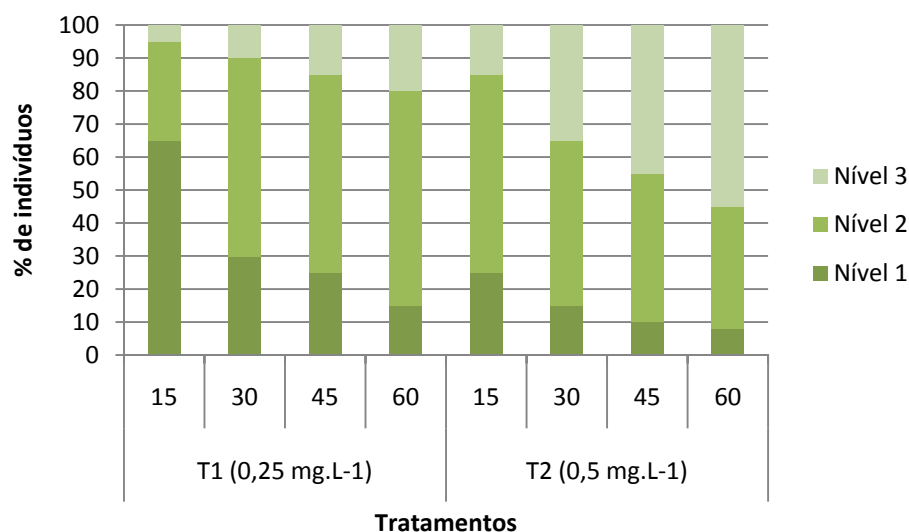


Figura 22 - Secções histológicas do fígado de *Diplodus sargus* expostos a  $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$  de cobre (Tratamento 2) durante o decorrer do ensaio (60 dias).



A: fígado de um organismo controlo; estrutura hepática normal, nível de alteração 1. G: (15 dias de tratamento) nível de alteração 2; H: (30 dias de tratamento) nível de alteração 2; I: (45 dias de tratamento) nível de alteração 3; J e K: (60 dias de tratamento) nível de alteração 3. hp, hepatócito; n, núcleo; ne, necrose. Coloração H&E. Ampliação 400×.

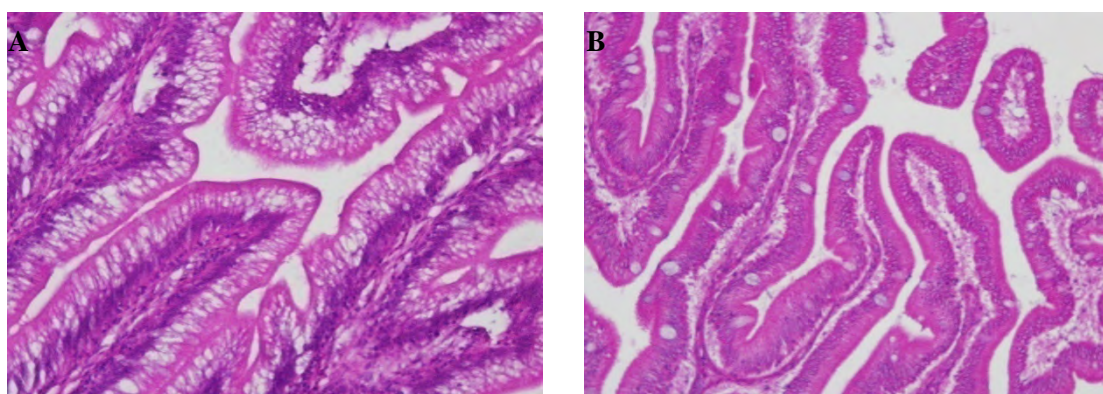
Figura 23 - Distribuição, em percentagem, dos organismos (*Diplodus sargus*) expostos a concentrações subletais de cobre, pelos diferentes níveis de alteração do tecido hepático



### c) Intestino

Com base nas observações efectuadas nos cortes histológicos do intestino verifica-se que não houve alterações dignas de registo entre os indivíduos controlo e os indivíduos expostos às duas concentrações de cobre durante o decorrer do ensaio (Figura 24). O intestino apresenta vilosidades longas, espessas e pouco ramificadas (Figura 24).

Figura 24 - Secções histológicas representativas do intestino de *Diplodus sargus*

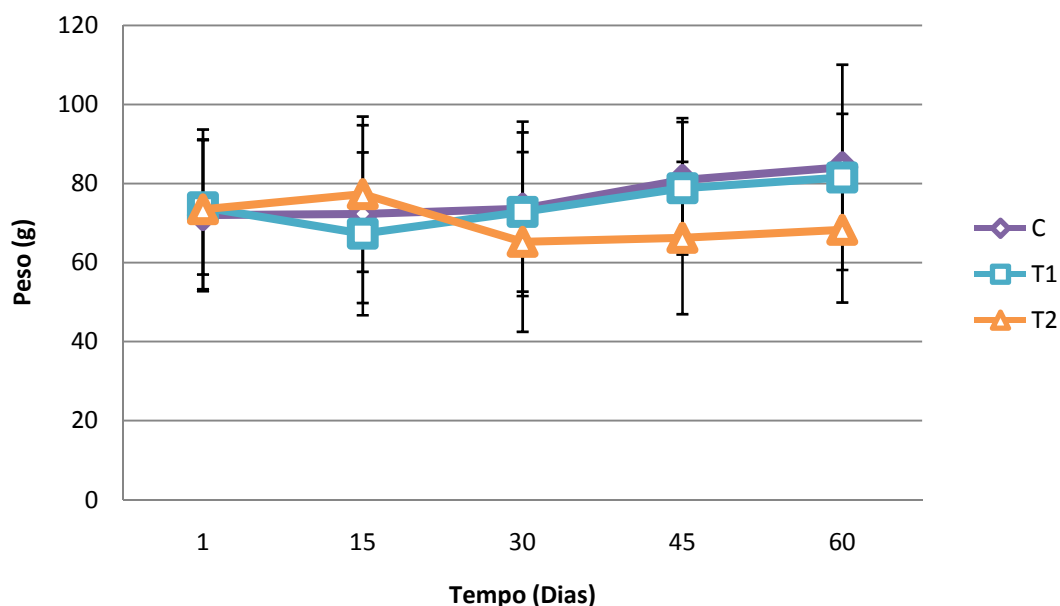


A: intestino de um organismo controlo; estrutura normal. B: intestino de um organismo submetido a 0,5 mg.L<sup>-1</sup> de cobre durante 60 dias; estrutura normal. Coloração H&E

### 6.2.5 Análise de Crescimento

Na análise de crescimento dos juvenis de sargo, verificou-se que há uma visível diminuição do peso dos peixes ao longo da exposição ao cobre, no tratamento 2, ou seja o tratamento correspondente à maior concentração de cobre na água (Figura 25). Relativamente ao grupo do tratamento 1 e ao grupo controlo verifica-se um ligeiro aumento do peso dos peixes ao longo dos 60 dias em que decorreu o ensaio (Figura 25).

Figura 25 - Peso do *Diplodus sargus* durante o período de exposição ao cobre (60 dias). Os dados apresentados são médias  $\pm$  D.P. ( $n = 120$  e  $n = 18$ , na primeira amostragem e restantes, respectivamente)



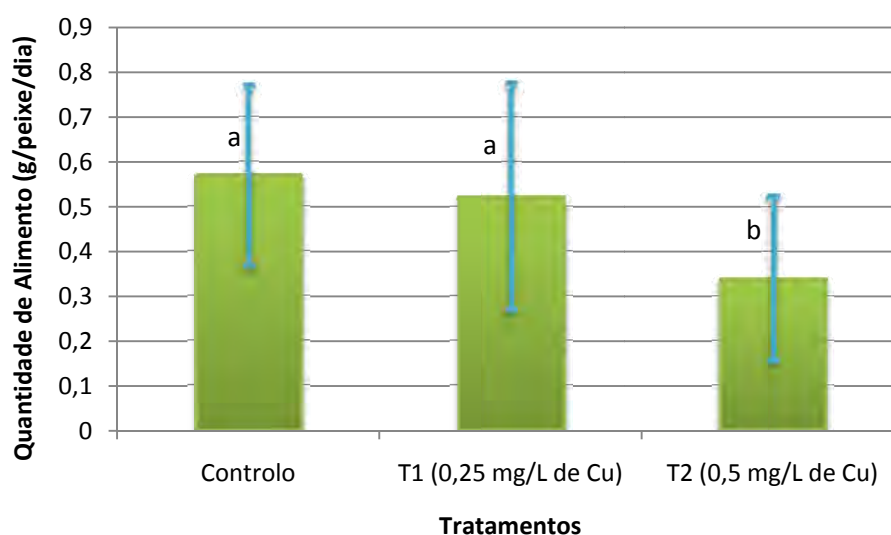
Pela análise dos dados referentes ao peso dos peixes podemos afirmar que não existem diferenças significativas ( $p = 0,078$ ) entre os três grupos de indivíduos utilizados neste ensaio. Ou seja, não podemos descrever nenhuma relação entre a ausência e as várias concentrações de cobre na água, e o aumento ou diminuição do peso dos peixes submetidos a este tratamento, apesar da visível diminuição do peso dos peixes no tratamento 2 ao longo do decorrer do ensaio.

## 6.2.6 Análise Comportamental

### a) Comportamento Alimentar

Com a observação do gráfico da figura 26 verifica-se que, quanto maior for a concentração de cobre presente na água, menor é a quantidade de alimento consumido.

Figura 26 - Comparação da quantidade de alimento ingerido pelos peixes (*Diplodus sargus*) entre os diferentes tratamentos (0,25 mg.L<sup>-1</sup> e 0,5 mg.L<sup>-1</sup>) e o grupo controlo. Existem diferenças significativas se as letras forem diferentes ( $p < 0,05$ )



Pela análise estatística (ANOVA a um factor) podemos afirmar que o grupo controlo e o grupo do tratamento 1 consumiram significativamente mais alimento que o grupo de indivíduos expostos à maior concentração de cobre ( $p < 0,05$ ), não se detectando diferenças significativas entre o grupo controlo e o grupo do tratamento 1 (0,25 mg.L<sup>-1</sup> de cobre).



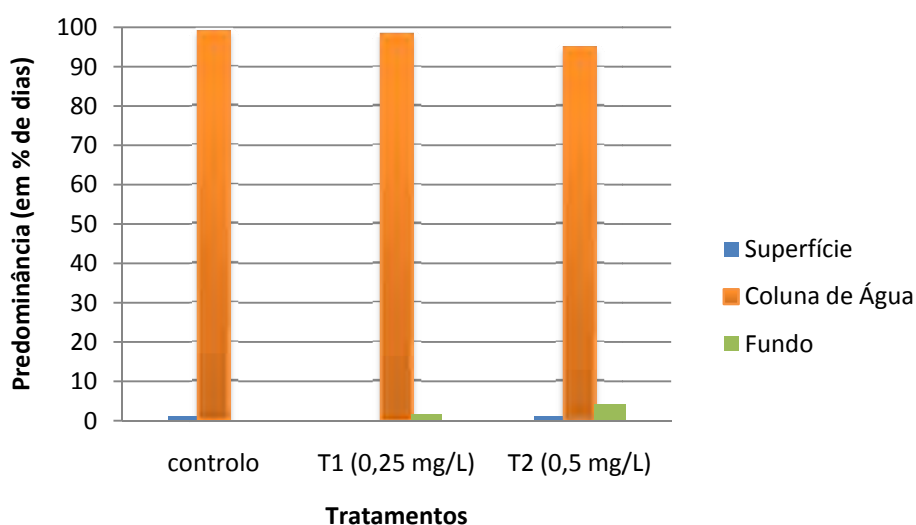
## b) Comportamento Natatório

Durante o período em que decorreu o ensaio pôde-se verificar que no grupo controlo e em ambos os tratamentos (0,25 e 0,5 mg.L<sup>-1</sup>) houve uma predominância dos indivíduos na coluna de água de mais de 90% dos dias (Figura 27).

Aproximadamente 1,17% dos dias da experiência, no grupo controlo e no grupo com maior concentração de cobre, os indivíduos encontravam-se à superfície do respectivo tanque (Figura 27).

Por último, aproximadamente 1,75 e 4,09 % dos dias, os indivíduos permaneceram no fundo do tanque no tratamento 1 (0,25 mg.L<sup>-1</sup>) e no tratamento 2 (0,5 mg.L<sup>-1</sup>), respectivamente (Figura 27).

Figura 27 - Predominância, em % de dias, dos indivíduos utilizados neste ensaio referentes ao grupo controlo e aos dois tratamentos (0,25 mg.L<sup>-1</sup> e 0,5 mg.L<sup>-1</sup>) na superfície, coluna de água e no fundo dos respectivos tanques.



## c) Cor

Neste ensaio, para podermos analisar quantos peixes apresentavam uma coloração escura, procedemos à estruturação de uma escala, na qual:

- --, nenhum peixe apresenta uma coloração escura (normal);
- +, 25% dos peixes apresentam uma coloração escura;
- ++, 50% dos peixes apresenta uma coloração escura;
- +++, 75% dos peixes apresentam uma coloração escura;



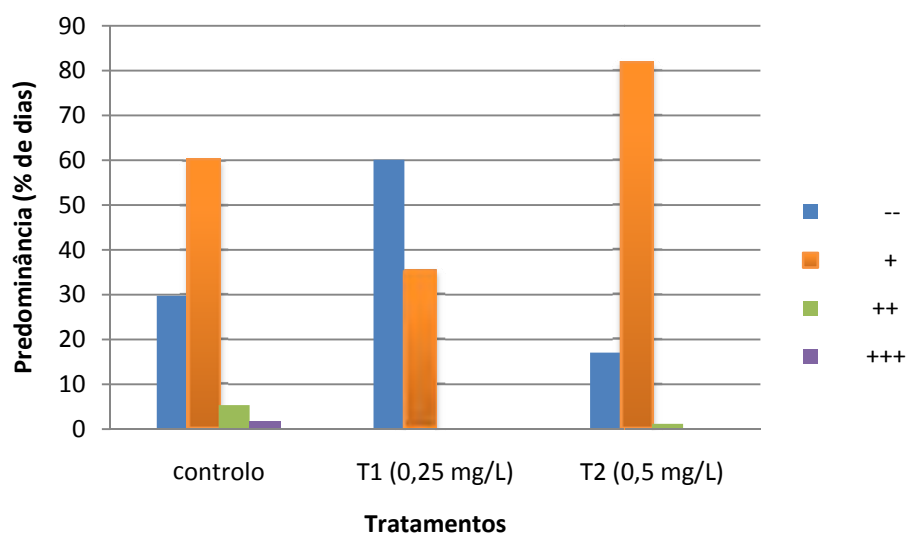
- +++, todos os peixes apresentam uma coloração escura.

Durante os 60 dias em que decorreu o ensaio, o grupo controlo permaneceu com uma coloração normal, aproximadamente 29,76 % do tempo, com 25% dos peixes com uma coloração escura, aproximadamente 60,1% do tempo de exposição, com 50% dos peixes com uma coloração escura, aproximadamente, 5,36% dos dias, e em apenas 1,75% do tempo que durou o ensaio houve uma presença de 75% dos peixes com uma coloração escura (Figura 28).

Analisando o tratamento 1 (0,25 mg.L<sup>-1</sup>), aproximadamente 60,12% dos dias em que decorreu o ensaio os peixes apresentaram uma coloração normal, e aproximadamente 35,29% dos dias do ensaio, 25% dos peixes presentes no tanque revelaram uma coloração mais escura (Figura 28).

Relativamente ao tratamento 2 (0,5 mg.L<sup>-1</sup>), aproximadamente 81,76% dos dias do ensaio, 25% dos indivíduos presentes apresentavam uma coloração escura, 17,02% do tempo em que decorreu o ensaio, todos os indivíduos apresentavam uma cor normal e, em apenas 1,18% do tempo, 50% de indivíduos apresentavam uma coloração escura (Figura 28).

Figura 28 - Predominância, em % de dias, da percentagem de indivíduos que permaneceram escuros durante o decorrer do ensaio



--, nenhum peixe com coloração escura (normal); +, 25% dos peixes apresentam uma coloração escura; ++, 50% dos peixes apresenta uma coloração escura; +++, 75% dos peixes apresentam uma coloração escura; +++, todos os peixes apresentam uma coloração escura.

## 7. Discussão dos Resultados

Existem poucos estudos sobre os efeitos da toxicidade do cobre no tratamento de peixes. Contudo, sabe-se que as espécies marinhas são, geralmente, menos sensíveis à exposição ao cobre que as espécies dulçaquícolas (Liu et al., 2010).

### 7.1 Qualidade da água e Mortalidade

As oscilações de cobre na água durante os ensaios foram tidas em linha de conta devido à formação de complexos com o Cu, à precipitação, à volatilização de cobre, entre outros, as quais também ocorrem naturalmente nos tanques de piscicultura. Por exemplo a concentração de carbonato de cálcio ( $\text{CaCO}_3$ ) na água influencia a biodisponibilidade do cobre (Alabaster e Lloyd, 1980; Peres, 1991), uma vez que os iões de cobre ao se ligarem ao carbonato de cálcio diminuem a sua disponibilidade na água e consequentemente a sua toxicidade (Mazon e Fernandes, 1999). Normalmente, no tratamento dos peixes, o sulfato de cobre é aplicado em concentrações que variam entre 0,15 e os 2  $\text{mg.L}^{-1}$  (Ling et al., 1993; Yanong, 2009), e este tratamento pode durar de vários minutos a vários dias (Varo et al., 2007). Desta forma, e tendo Díaz (2006) detectado que a concentração de 2  $\text{mg.L}^{-1}$  de cobre era fatal durante oito dias para juvenis de *Sparus aurata* expostos a este metal, decidimos usar as concentrações de 0,2, 0,5 e 1  $\text{mg.L}^{-1}$  no primeiro ensaio, ao qual teve uma duração de 23 dias. Como se verificou que a concentração de 1  $\text{mg.L}^{-1}$  se tornara tóxica para os indivíduos expostos, no segundo ensaio, visto ser mais prolongado (60 dias), resolvemos utilizar as concentrações de 0,25 e 0,5  $\text{mg.L}^{-1}$  de cobre. Os valores observados na água no primeiro ensaio, ao fim de 4 horas da adição de cobre, foram  $0,21 \pm 0,11$ ,  $0,52 \pm 0,22$  e  $1,16 \pm 0,35$   $\text{mg.L}^{-1}$ , respectivamente. No segundo ensaio os valores observados ao fim de 4 horas de se ter adicionado o cobre à água foram  $0,1 \pm 0,05$  e  $0,2 \pm 0,07$   $\text{mg.L}^{-1}$ , respectivamente. Estas grandes oscilações podem também ter ocorrido devido a erros de medição provocados pelo kit utilizado para a medição de cobre na água. Esta hipótese é sustentada pelos testes feitos com o mesmo kit em água que seguramente não continha cobre mas que o resultado era positivo, dando por vezes concentrações elevadas.

No primeiro ensaio, no tratamento com menor concentração de cobre (0,2  $\text{mg.L}^{-1}$ ) morreu somente um peixe no terceiro dia de exposição ao cobre. No tratamento 2 (0,5  $\text{mg.L}^{-1}$ ) morreram dois peixes, um no início do ensaio (dia 2) e outro no final do ensaio (dia 18). Desta

forma, é importante referir que não se registou elevada mortalidade. No tratamento 3 ( $1 \text{ mg.L}^{-1}$ ) a mortalidade aumentou para 13% e ocorreu ao longo do ensaio com maior predominância a partir do décimo terceiro dia. No segundo ensaio não se registou mortalidade nos indivíduos controlo. No tratamento 1 ( $0,25 \text{ mg.L}^{-1}$ ) registou-se 1 morto no vigésimo quinto dia de exposição ao cobre, e no tratamento 2 ( $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$ ) houve um aumento ligeiro da mortalidade a partir do décimo terceiro dia do ensaio, tendo morrido no total 8 peixes dos 120 pertencentes a este grupo.

Os peixes, quando expostos às diversas concentrações de cobre, sobreviveram durante os primeiros dias, não se registando uma elevada mortalidade em nenhum dos ensaios nem em nenhuma das diversas concentrações de cobre aplicadas. Assim, há evidências que é possível manter os peixes numa concentração de cobre superior àquela que é normal existir na água sem que esse se mostre tóxico para os mesmos provocando a sua mortalidade. Isto porque quando os peixes são expostos a agressões externas tendem a manifestar reacções comportamentais ou metabólicas de defesa. No caso de uma contaminação por metais, neste caso o cobre, verifica-se que a captura do metal ocorre em diversos tecidos e órgãos envolvidos nas vias de entrada (ex: brânquias, intestino), transporte, utilização e eliminação de metais (ex: fígado e rins), cujo objectivo é a desintoxicação do organismo.

Este estudo demonstrou que com maiores concentrações de cobre na água, maior e mais rápida será a mortalidade.

## **7.2 Quantificação de cobre**

A análise dos resultados permite constatar que à semelhança do que aconteceu neste estudo, em muitos outros (De Boeck et al., 1997; Arrelano et al., 1999b; Mazon e Fernandes, 1999; Al-Yousuf et al., 2000; Roméo et al., 2000; Canli & Atli, 2003; Peyghan et al., 2003; Reddy et al., 2005; Sidoumou et al., 2005; Díaz, 2006) verificou-se que, geralmente, o fígado apresenta uma maior concentração de cobre do que os outros órgãos, nomeadamente o músculo, o órgão tido em conta neste ensaio. Esta maior concentração no tecido hepático pode resultar da tendência que este elemento tem em reagir com metaloproteínas (metaloteínas), grupos amina e carboxilases, os quais são produzidos em elevadas quantidade a nível do fígado e que armazenam o cobre de forma não tóxica (Al-Yousuf et al., 2000). O alto conteúdo de cobre no fígado pode indicar, em parte, uma protecção aos outros órgãos da acumulação de cobre em excesso (Grosell et al., 2001). Este órgão, não só é fundamental na retenção de vários metais (Arrelano et al., 1999b; Canli & Atli, 2003; Dural et al., 2006)

como também é determinante na redistribuição, transformação ou eliminação dos contaminantes (Evans et al., 1993). O aumento da eliminação de cobre pelo fígado é um aspecto importante para os peixes durante a exposição crónica (Grosell et al., 2001).

Considera-se que as brânquias são a principal via de entrada de cobre, particularmente em peixes de água doce, devido à sua extensa área de contacto com a água e à estreita barreira que separa o exterior do interior do organismo. Contudo, a acumulação de cobre é menos evidente nas brânquias do que no fígado. A absorção deste metal através das brânquias (Grosell e Wood, 2002; Grosell et al., 2002; Handy et al., 2002; Campbell et al., 1999) parece resultar de uma combinação entre o metal absorvido pela superfície branquial e a sua posterior transferência através das brânquias, o que pode sugerir um processo contínuo de transferência do cobre para a corrente sanguínea. Assim, é geralmente aceite que o metal que entra através das brânquias e, menos intensamente através da superfície do corpo, é transportado para o fígado através da corrente sanguínea, onde é metabolizado e posteriormente excretado através da biliar (Mazon e Fernandes, 1999). Quando ocorre a exposição a concentrações elevadas de cobre e a capacidade de remoção do fígado é excedida, as formas mais tóxicas do cobre podem ser transportadas através da corrente sanguínea até outros órgãos (Laurén e McDonald, 1987a,b).

#### **a) Fígado**

Os dados obtidos para o fígado no início do ensaio 1 e 2 foram: 80,22 e 5,60  $\mu\text{g.g}^{-1}$  de peso seco, respectivamente. O valor máximo da concentração de cobre no fígado ocorreu no ensaio 1, no tratamento de maior concentração de cobre (1  $\text{mg.L}^{-1}$ ) e ao fim de 23 dias de exposição, e foi quantificado em 1037,07  $\mu\text{g.g}^{-1}$  de peso seco. Os resultados que obtivemos no grupo controlo foram inferiores aos obtidos por Arrelano et al. (1999a) em *S. senegalensis* (aproximadamente 125  $\mu\text{g.g}^{-1}$  de peso seco) e, quando este expôs os indivíduos a 0,1  $\text{mg.L}^{-1}$  de Cu durante 7 dias a concentração observada no tecido hepático foi, aproximadamente, 300  $\mu\text{g.g}^{-1}$  de peso seco, o que se revela superior ao observado nos nossos ensaios relativamente às concentrações de 0,2, 0,25 e 0,5  $\text{mg.L}^{-1}$  de cobre durante o decorrer dos ensaios. A concentração de cobre no grupo controlo da espécie *Fundulus heteroclitus* foi de cerca de 60  $\mu\text{g.g}^{-1}$  de peso seco (Arrelano et al., 1999b). Para a enguia europeia (*Anguilla anguilla*) o valor obtido no grupo controlo foi de, aproximadamente, 32,5 $\pm$ 5,5  $\mu\text{g}$  de cobre/g de peso seco e, o valor máximo registado ocorreu nos indivíduos expostos 94  $\mu\text{g.L}^{-1}$  de cobre durante 28 dias, sendo este de 112,1 $\pm$ 9,3  $\mu\text{g}$  de cobre/g de peso seco (Grosell et al., 1998). Antognelli et

al. (2003) mostrou que existe acumulação de cobre no fígado de *Sparus aurata* expostas ao tratamento com sulfato de cobre. E Díaz (2006) observou uma concentração de  $7,2 \mu\text{g.g}^{-1}$  de cobre no grupo controlo de *S. aurata* registando um valor máximo ( $168,8 \mu\text{g.g}^{-1}$ ) no tratamento com  $0,8 \text{ mg.L}^{-1}$  de cobre e ao fim de 26 dias de exposição.

Analisando os dados da concentração de cobre no fígado verifica-se que, em ambos os ensaios, a concentração de cobre foi significativamente mais elevada ( $p < 0,05$ ), no fígado dos peixes expostos às maiores concentrações de cobre ( $1 \text{ mg.L}^{-1}$  e  $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$  no Ensaio 1 e 2, respectivamente) comparativamente com os peixes expostos à menor concentração de cobre, no último dia de amostragem. Tais resultados têm sido demonstrados para diversas espécies expostas ao cobre dissolvido na água (Mazon e Fernandes, 1999; Mazon et al., 2002b; Pelgrom, 2004; Reddy et al., 2005; Díaz, 2006; Liu et al., 2010). Relativamente ao ensaio 1, identifica-se no tratamento 1 e 2 ( $0,2$  e  $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$  de cobre, respectivamente) um período inicial em que os organismos parecem ter maior capacidade para resistir à intoxicação pelo cobre, havendo um pequeno aumento da concentração de cobre a partir do décimo sexto dia de exposição, não existindo diferenças significativas ( $p > 0,05$ ) entre os dois tratamentos. No tratamento 3 ( $1 \text{ mg.L}^{-1}$  de cobre) verifica-se um aumento da concentração de cobre no fígado ao longo do ensaio. Relativamente ao ensaio 2 verifica-se uma concentração de cobre no fígado significativamente mais elevada ( $p < 0,05$ ) no tratamento 2 ( $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$  de cobre) em comparação com o tratamento de  $0,25 \text{ mg.L}^{-1}$  de Cu e controlo, não havendo diferenças significativas ( $p > 0,05$ ) entre estes últimos. A tendência do teor de cobre no fígado é de aumentar até, aproximadamente, ao décimo quinto dia de exposição a este metal, diminuindo de seguida até ao quadragésimo quinto dia e voltando a aumentar até ao sexagésimo dia de exposição, correspondendo ao final do ensaio. Com efeito, parece observar-se uma certa estabilização seguida de diminuição da concentração de cobre, que se presume poder corresponder a uma fase em que a retenção de tóxico pelos organismos atinge um equilíbrio, quer por exaustão da sua capacidade de retenção, quer por funcionamento de mecanismos de eliminação do tóxico. Estes dados parecem sugerir que o cobre se acumula no fígado em função do tempo de exposição e que estabiliza quando o animal se adapta à exposição, procedendo de seguida à eliminação do tóxico. Outros estudos laboratoriais também referem que a acumulação de cobre no fígado dos peixes depende do tempo de exposição e atinge o equilíbrio, normalmente, num período de 30 dias de exposição. Jacobson & Reimschuessel (1998) verificaram que a acumulação de cobre no fígado de *Carassius auratus* estabilizou após 11 dias de exposição a  $100 \mu\text{g.L}^{-1}$  de cobre. De Boeck et al., (1997) verificaram que a acumulação de cobre ocorreu essencialmente no fígado de *Cyprinus carpio* e que atingiu um equilíbrio entre a entrada e a excreção após um mês de exposição. A adaptação pode ocorrer

após 4 semanas de exposição ao cobre devido ao aumento da síntese de metalotioninas que se ligam ao cobre que se encontra em excesso (Roesijadi, 1994), ou através da regulação entre a entrada e a excreção de cobre, no sentido de evitar a acumulação de cobre no fígado. Assim, os níveis de cobre no fígado podem manter-se constantes nos organismos ou ser depurados ao fim de 4 semanas de exposição, dependendo dos mecanismos que forem mais predominantes (Buckley et al., 1982). Uma vez que desconhecemos os valores entre os 15 e os 30 dias de exposição ao cobre não podemos afirmar que atingiu um equilíbrio neste período mas, devido ao trigésimo dia de exposição o teor de cobre ser inferior comparativamente com o décimo quinto dia de exposição, parece ter havido uma estabilização seguida de depuração.

## **b) Músculo**

A acumulação de cobre em tecidos, como é o caso do músculo, ocorre quando a capacidade máxima de armazenamento no fígado é excedida (Laurén e McDonald, 1987).

A análise dos resultados obtidos pela quantificação de cobre no músculo demonstrou que não existem diferenças significativas entre as várias concentrações de cobre utilizados em ambos os ensaios. Foi comprovado em várias espécies que o músculo não é um tecido activo na acumulação de metais pesados (Karadede and Üniü, 2000; Yilmaz et al. 2007). De Boeck et al. (1997), Antognelli et al. (2003), Romani et al. (2003) e Liu et al. (2010) não encontraram diferenças significativas na acumulação de cobre no músculo de várias espécies de peixes após o tratamento com sulfato de cobre.

Neste estudo houve alguma variabilidade dos resultados, por exemplo, no primeiro ensaio, a concentração de cobre no músculo na última amostragem do tratamento com 0,5 mg.L<sup>-1</sup> foi de  $3,18 \pm 1,49 \mu\text{g.g}^{-1}$  de peso seco e, no ensaio 2 com a mesma concentração e após 15 dias de exposição o resultado foi de  $1,46 \pm 0,57 \mu\text{g.g}^{-1}$  e ao fim de 30 dias foi de  $1,6 \pm 0,42 \mu\text{g.g}^{-1}$  de peso seco. Esta variabilidade de cobre no músculo é suportada por vários autores. Yilmaz (2005) observou uma concentração de cobre no músculo de dourada de  $0,51 \pm 0,34$  e  $0,32 \pm 0,18 \mu\text{g.g}^{-1}$  de peso seco e, Antognelli et al. (2003) observou valores de  $0,38 \pm 0,10 \mu\text{g.g}^{-1}$  de peso seco no grupo controlo e de  $32 \pm 0,08 \mu\text{g.g}^{-1}$  de peso seco no músculo de peixes expostos durante 20 dias a 0,5 ppm de cobre. Romani et al. (2003) observaram valores de  $0,82 \pm 0,23 \mu\text{g.g}^{-1}$  de peso seco no grupo controlo e  $0,85 \pm 0,21 \mu\text{g.g}^{-1}$  de peso seco no tratamento com 0,5 ppm durante 20 dias.

Como não possui limites máximos estipulados pela legislação, não se pode afirmar se estaria ou não em quantidades inadequadas ao consumo. Mas quando comparamos os valores

obtidos neste trabalho com os valores estabelecidos por outros países, como é o exemplo do Reino Unido e da Espanha em que o valor limite é de  $20 \mu\text{g.g}^{-1}$  de peso seco, podemos assegurar que a concentração de cobre obtida no músculo dos peixes expostos a várias concentrações de Cu ( $0,2 - 1 \text{ mg.L}^{-1}$ ) está abaixo do limite máximo estipulado e, que não representa qualquer risco ao consumo humano.

O tecido muscular dos peixes é a porção consumida pelo ser humano e, apesar da taxa de acumulação de cobre ser relativamente baixa, a análise de cobre neste, é de fundamental importância para que órgãos responsáveis, como o Ministério da Saúde, possam definir os possíveis índices de contaminação para os consumidores.

### **7.3 Histologia**

Os resultados da análise histológica efectuada em *D. sargus* expostos às diferentes concentrações subletais de cobre, 0,2, 0,25, 0,5 e  $1 \text{ mg.L}^{-1}$ , mostram alterações ao nível da estrutura do tecido branquial e hepático, sugerindo que este metal, mesmo em níveis subletais afecta as brânquias e o fígado dos peixes.

Em vários estudos sobre os efeitos da acumulação de cobre em peixes foram evidenciados diversas lesões estruturais em diferentes tecidos dos indivíduos após a sua exposição a concentrações de cobre.

#### **a) Brânquias**

As brânquias, do ponto de vista morfológico e fisiológico, são um órgão muito complexo que está envolvido em diversas funções vitais, tais como a respiração, a osmorregulação, o equilíbrio ácido-base e a excreção e, apresentam uma grande área superficial em contacto com o meio exterior (Goss et al., 1998; Franchini et al., 1999; Cerqueira e Fernandes, 2002; Mazon et al., 2002a; Grosell et al., 2002; Monteiro, 2009), o que as torna vulneráveis a diversos poluentes presentes na água (Oropesa-Jiménez et al., 2005). Distintos estudos efectuados a peixes expostos a vários poluentes mostram que as brânquias são particularmente sensíveis a alterações físico-químicas no ambiente aquático (Mazon et al., 2002a) tornando-se o principal órgão alvo dos poluentes tóxicos que se encontram no meio.

Elevados níveis de metais são acumulados neste tecido por absorção e adsorção (Dural et al., 2006), sendo uma fracção importante na total quantificação de metais encontrados em vários órgãos do organismo (Heath, 1987). A absorção de um químico pelas brânquias pode ser descrita da seguinte forma: (1) absorção através do epitélio branquial; (2) transporte do epitélio para o sangue; (3) incorporação no sangue, incluindo ligação às proteínas do plasma; (4) transporte via sistema circulatório para vários tecidos; (5) transporte dentro dos tecidos (fígado, rim e músculo, por exemplo) (Kleinow et al., 2008).

Diversos estudos foram realizados com o objectivo de quantificar a concentração de cobre nas brânquias. Segundo Grosell et al. (1998, 2004) a concentração total de cobre nas brânquias de enguias aumentou com o aumento do teor de cobre na água. Alguns estudos demonstraram que a concentração de cobre no tecido branquial aumentou significativamente de forma dependente da concentração e do tempo durante o período de exposição (Monteiro et al., 2009). Arrelano et al., (1999) verificaram maiores concentrações de cobre no fígado do que nas brânquias de *S. senegalensis* durante o período de exposição a este metal, e uma diminuição desse teor após um período de desintoxicação (Kalay e Canli, 2000).

Associado à acumulação de cobre foram observadas várias alterações morfológicas no tecido branquial (Nowak et al., 1996; Arrelano et al., 1999; De Boeck et al., 2004; Mazon et al., 2002; Liu et al., 2010). No tecido branquial de *Cyprinus carpio* expostos a diferentes concentrações de sulfato de cobre (0,25; 0,5; 1; 2 e 4 mg.L<sup>-1</sup>) Karan et al., (1998) verificaram essencialmente hiperplasia, edema do epitélio e alterações ao nível das células de cloro e de muco. Arrelano et al., (1999) observaram em *Solea senegalensis* expostos a 100 µg.L<sup>-1</sup> de cobre, alterações nas células epiteliais, hiperplasia e fusão lamelar. No tecido branquial de *Prochilodus scrofa* expostos a 29 µg.L<sup>-1</sup> de cobre, Cerqueira e Fernandes (2002), Mazon et al., (2002a, b) e Liu et al., (2010) detectaram sobretudo edema do epitélio branquial, proliferação de células de cloro e de muco e anomalias nos vasos sanguíneos. Muhvich et al., (1995) verificaram em *Carassius auratus* expostos a 100 e a 175 µg.L<sup>-1</sup> de cobre diferentes níveis de hiperplasia. Neste estudo em *Diplodus sargus* expostos a concentrações subletais de cobre (0,2; 0,25; 0,5 e 1 mg.L<sup>-1</sup>) observou-se hiperplasia, hipertrofia, edema, alterações ao nível das células, dos vasos sanguíneos e em situações mais severas, necrose.

Algumas das lesões acima referidas foram detectadas em *Carassius carassius* var. *auratus* expostos a chumbo (Franchini et al., 1999), em *Carassius auratus* expostos a cádmio, chumbo e zinco (Zhang et al., 2005), em *Carassius auratus* e *Perca flavescens* expostos a resíduos provenientes de indústrias de exploração de minérios (Nero et al., 2006) e em *Cyprinus carpio* expostos a herbicidas (Oropesa-Jiménez et al., 2005). Assim, considera-se que essas alterações são comuns a vários tóxicos e algumas delas, como o edema e diferentes



graus de hiperplasia, são mecanismos de defesa típicos, como indicado por Mallatt (1985), que aumentam a distância de difusão entre o poluente e a corrente sanguínea diminuindo o espaço interlamelar das lamelas secundárias. Contudo, como as brânquias são o principal local de trocas gasosas e desempenham outras importantes funções como a regulação iônica e osmótica e a manutenção do equilíbrio ácido-base (Goss et al., 1998), alterações morfológicas na sua estrutura causam anomalias nas trocas gasosas, nomeadamente a redução da capacidade de difusão de oxigénio (De Boeck et al., 1995).

Neste estudo, as lesões no tecido branquial tornaram-se evidentes logo após 15 dias de exposição e, de um modo geral, a severidade aumentou de acordo com a concentração de cobre, à semelhança do verificado por Karan et al., (1998) para *Cyprinus carpio*, observando-se com maior incidência nos indivíduos expostos à concentração mais elevada a fusão completa de várias lamelas e edemas mais severos. Para além disso, é importante salientar que, no tratamento com 0,25 mg.L<sup>-1</sup> de cobre, após 30 dias de exposição a este metal não houve agravamento das lesões provocadas anteriormente e, no final do segundo ensaio (60 dias de exposição ao cobre), algumas das lesões anteriormente mencionadas foram mais ligeiras nalguns indivíduos.

Estes resultados parecem estar de acordo com o modelo Dano-Reparo (Damage-Repair) (McDonald e Wood, 1993) que caracteriza o processo geral de aclimação aos metais resultante da exposição crónica subletal. Segundo este modelo, este processo é constituído por três fases. A fase inicial de choque tem curta duração e corresponde ao período em que se verificam danos, principalmente nas brânquias. Seguidamente a fase de recuperação inicia-se simultaneamente com os processos de biossíntese envolvidos na reparação das lesões e na correcção de distúrbios fisiológicos. Esta fase está ainda associada à mobilização de metalotioninas. Por fim, verifica-se a fase de aclimação em que se verifica um aumento da tolerância, que persiste indefinidamente durante a exposição continuada.

Neste estudo não foi possível verificar um período de recuperação ao qual os peixes permaneceriam num ambiente sem qualquer adição de sulfato de cobre. Mas vários estudos (Karan et al., 1998; Cerqueira e Fernandes, 2002; Díaz, 2006) descrevem uma reversibilidade das lesões provocadas pelo cobre nas brânquias, verificando-se que a recuperação total para os peixes expostos a concentrações de cobre é variável.

## b) Fígado

Os efeitos do cobre no metabolismo hepático dos peixes são bastante numerosos (Grosell et al., 1998; Grosell et al., 2004). Os metais presentes no meio aquático quando em quantidade superior ao considerado normal podem aumentar ou diminuir a actividade de enzimas hepáticas (ou seja, catalase, superóxido dismutase, glutathione peroxidase, glutathione reductase) e, este efeito vai depender da concentração e do tipo de metal, da espécie do peixe em causa, da dureza da água, do tempo de exposição, entre outros (Reddy et al., 2005; Radi and Matkovics, 1988; Rodriguez-Arriza et al., 1993; Furuno et al., 1996; Shimizu et al., 1997).

Neste estudo, a análise morfológica do fígado de indivíduos expostos às várias concentrações de cobre indicou que as alterações verificadas consistem essencialmente na perda de aderência entre os hepatócitos e na desorganização da estrutura celular, demonstrada pela desintegração da membrana citoplasmática e, em alguns casos, pela presença de núcleos picnóticos e zonas de necrose. Outros estudos sobre os efeitos decorrentes da acumulação de cobre no fígado de peixes evidenciaram alterações, após o tratamento com diversas concentrações de cobre. Peres (1991) observou um aclaramento do tecido hepático de *Cyprinus carpio* após quatro semanas de exposição a  $23 \mu\text{g.L}^{-1}$  de cobre e constatou que a deterioração do tecido se acentuou na presença de 55 e  $150 \mu\text{g.L}^{-1}$  de cobre. No fígado de *Solea senegalensis* expostos a  $100 \mu\text{g.L}^{-1}$ , Arrelano et al., (1999) observaram um aumento no número de gotas lipídicas, sinusóides com eritrócitos e ocasionalmente observaram necrose hepatocelular. Paris-Palacios e Biagianti-Risbourg (2006) expuseram dois ciprinídeos, *Brachydanio rerio* e *Rutilus rutilus*, ao cobre e verificaram um aumento do tamanho nucleolar e nuclear dos hepatócitos. Neste estudo, de um modo geral, verifica-se que a degeneração e a perda de integridade do tecido hepático se acentuaram com o aumento da concentração e com o período de exposição. No ensaio 2, apesar de os teores de cobre determinados no tecido hepático dos indivíduos expostos a  $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$  de cobre parecerem sugerir uma certa estabilização seguida de diminuição após 15 dias de exposição, as lesões manifestadas por esses indivíduos continuaram acentuadas até ao fim da exposição.

Diversos estudos, de vários autores, constataram a presença de vacuolos lipídicos no fígado (Arrelano et al., 1999a; Díaz, 2006; Paris-Palacios e Biagianti-Risbourg, 2006; Liu et al., 2010). No nosso estudo foi observado vacuolos lipídicos em todos os grupos, posto isto não podemos atribuir tal acontecimento à exposição ao cobre.

Neste estudo não foi possível verificar se há ou não recuperação do fígado após a exposição ao sulfato de cobre mas, diversos estudos relatam que é possível a recuperação total

ou parcial deste órgão, consoante a concentração e o tempo de exposição ao cobre aquando da paragem da utilização deste metal (Arrelano et al., 1999b; Grosell et al., 1998; Díaz, 2006).

A exposição ao cobre também pode interferir em diversas vias metabólicas e induzir várias respostas bioquímicas. Por exemplo, este metal foi descrito como promotor de stress oxidativo por catalisar a formação de espécies de oxigénio altamente reactivas (ROS), tal como o radical  $\cdot\text{OH}$  através da reacção de Haber-Weiss (Rómeo et al., 2000; Chen et al., 2004; Varo et al., 2007) e gerar peroxidação de lípidos das membranas (Radi and Matkovich, 1988; Furuno et al., 1996; Shimizu et al., 1997) e alterações no DNA (Varo et al., 2007).

### **c) Intestino**

A concentração de metais no intestino representa a incorporação recente de metal via alimentação, visto a literatura não relacionar este órgão com o armazenamento destes elementos. São escassos os dados na literatura que quantificam metais no intestino.

Relativamente ao nosso estudo não foram verificadas alterações morfológicas ao nível do tecido intestinal em nenhum dos tratamentos utilizados. Peres (1991) verificou que o intestino é o órgão menos sensível não detectando manifestações em nenhuma das concentrações de cobre utilizadas.

## **7.4 Efeitos do cobre no crescimento**

Quando os animais perdem a capacidade de adaptação, ou quando não conseguem excretar os contaminantes, podem ocorrer lesões (Kalay et al., 2000). De facto, apesar de existir um maior número de vias de eliminação do que de introdução de poluentes nos organismos, a acumulação dos metais é de tal forma rápida, devido à presença das metaloproteínas nos tecidos, que pode superar a taxa de supressão pelos indivíduos (Kargin & Çoğun, 1999). Para além dos aspectos que têm sido relatados ao longo deste estudo sobre os efeitos do cobre no sargo, é importante estudar o índice de condição em que se encontram os indivíduos.

Maes et al. (2005) obtiveram uma evidente relação entre o aumento do teor de metais pesados na enguia-europeia e a diminuição do seu índice de condição, apontando como justificação o gasto acrescido de energia resultante do processo de desintoxicação a que os indivíduos estão sujeitos. Nowak & Duda (1996) observaram uma diminuição do crescimento

de truta arco-íris exposta a  $2,7 \mu\text{g.L}^{-1}$  de cobre durante 6 semanas. Em *Synechogobius hasta* também se pôde observar uma diminuição do crescimento e, esta redução pode ser devida a um aumento do gasto metabólico para desintoxicar o organismo e mantendo as suas funções normais (Liu et al., 2010). Fonseca et al. (2009) observou uma diminuição da taxa de crescimento em *Solea senegalensis* com o aumento da concentração de cobre na água.

No entanto, para os sargos expostos a concentrações entre 0,2 e  $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$ , não foram detectadas diferenças estatisticamente significativas entre as diferentes concentrações de cobre utilizados no segundo ensaio, apesar da visualização de uma diminuição do peso dos peixes no tratamento com maior concentração de cobre na água durante o decorrer do ensaio. Assim, não podemos concluir que este metal afecta o crescimento dos indivíduos expostos a 0,25 e  $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$  durante 60 dias.

## 7.5 Alterações no comportamento

O comportamento dos peixes e as respostas fisiológicas a vários agressores específicos têm sido amplamente utilizados para determinar a saúde individual e populacional destes indivíduos, tal como a qualidade do habitat em que estes se encontram (Fonseca et al., 2009).

A capacidade de natação é fundamental para os peixes, determinando a sua sobrevivência dentro do ambiente aquático (Vieira et al., 2009).

Nos peixes expostos a metais pesados tem-se relatado várias alterações comportamentais (Shah, 2002; Díaz, 2006). Neste estudo foi observado o comportamento alimentar, onde se verificou a quantidade de alimento consumida, o comportamento natatório, onde se analisou qual a posição que os indivíduos ocupavam nos tanques e, a tonalidade da cor que estes apresentaram durante o decorrer do ensaio. Podemos verificar que quanto maior a concentração de cobre na água, menor a quantidade de alimento consumido. Relativamente à posição que os peixes ocupavam no tanque, foi predominantemente na coluna de água, posição essa que eles ocupariam no seu estado normal sem que houvesse adição de cobre. Aquando da análise da tonalidade de cor que os indivíduos apresentavam, não podemos afirmar que o cobre tem influência, devido ao grupo controlo ter tido uma incidência de 25% de peixes com coloração mais escura durante aproximadamente 60% do tempo de exposição ao cobre.

Díaz (2006), em douradas (*Sparus aurata*) expostas a várias concentrações de cobre, observou: natação irregular; indivíduos predominantemente à superfície; alterações dos movimentos de boca; e, arritmia opercular. Características semelhantes foram observadas por

Shah (2002) em *Cyprion watsoni* quando exposto a  $0,06 \text{ mg.L}^{-1}$  de cobre durante 7 dias e por Veena et al. (1997) em *Etroplus maculatus* quando exposto a cobre, mercúrio e selênio. Ghatak e Konar (1990) observaram perda de equilíbrio, movimentos irregulares do opérculo e natação superficial em *T. mossambica* quando expostos a várias concentrações de cádmio. Letargia e perda de equilíbrio também foi observada por Shah (2002) em *C. watsoni* quando exposto a  $0,12 \text{ mg.L}^{-1}$  de Cu durante os 7 dias de tratamento e, em *Heteropneustes fossilis* (Singh and Reddy, 1990) quando em contacto com  $0,25 \text{ mg.L}^{-1}$  de cobre, simultaneamente com frequentes idas à superfície. Straus (2003), em *Oreochromis aureus*, com concentrações de  $0,18 \text{ ppm}$  de Cu, observou natação errática dos indivíduos, letargia, perda de equilíbrio e uma predominância dos peixes no fundo do tanque. Varanka et al. (2001), para além do relatado anteriormente, detectou que *C. carpio* parecia exausto após dois dias de tratamento com  $10 \text{ mg.Kg}^{-1}$  de cobre. Vieira et al. (2009) observou perda de resistência natatória nos peixes (*Pomatoschistus microps*) expostos a várias concentrações de metais (mercúrio e cobre), assim como uma diminuição da distância percorrida.

## 8. Considerações Finais

O estudo da toxicidade do cobre em *Diplodus sargus*, realizado no âmbito do presente trabalho, permitiu concluir que a espécie estudada apresentava diferentes níveis de alterações morfológicas e histoquímicas quando exposta a várias concentrações de sulfato de cobre (0,2 – 1 mg.L<sup>-1</sup> de Cu) durante um período máximo de 60 dias.

A avaliação dos efeitos da exposição de *D. sargus* a concentrações subletais de cobre, 0,2, 0,25, 0,5 e 1 mg.L<sup>-1</sup>, permitiu concluir que a concentração de cobre no músculo não foi significativamente afectada pelos diferentes tratamentos e diferentes tempos de exposição ao sulfato de cobre, enquanto, que a concentração deste no fígado aumentou de acordo com o aumento da concentração de cobre na água, assim como do tempo de exposição até atingir um máximo, estabilizando e diminuindo de seguida, podendo indicar uma adaptação dos indivíduos ao cobre e posterior eliminação do tóxico.

As alterações morfológicas mais significativas ao nível do tecido branquial dos indivíduos expostos aos vários tratamentos consistiram em hiperplasia, hipertrofia, edema, alterações ao nível das células e dos vasos sanguíneos. Ao nível do fígado, as principais lesões identificadas consistiram na degeneração e perda de integridade do tecido hepático.

Não foram encontradas alterações estatisticamente significativas ao nível do crescimento dos peixes, o que podemos concluir que estas concentrações (0,25 e 0,5 mg.L<sup>-1</sup> de Cu) não afectam a condição física dos indivíduos expostos ao cobre, pelo menos durante 60 dias.

A análise comportamental demonstrou uma diminuição da quantidade de alimento ingerido nos peixes que se encontravam expostos à maior concentração de sulfato de cobre mas, relativamente à posição que estes ocupavam no tanque e, à cor que apresentavam, não foram detectadas diferenças que pudessem ser explicadas pela adição ou não de cobre.

Há evidências do efeito tóxico durante a exposição ao sulfato de cobre, com um aumento da concentração de cobre no fígado acompanhada por alterações morfológicas em peixes. No entanto, o sargo tem capacidade de se adaptar a baixos níveis de cobre durante pelo menos 60 dias devido aos seus mecanismos fisiológicos de regulação.

A concentração de cobre no músculo nos indivíduos expostos ao sulfato de cobre não foi significativamente diferente da concentração de cobre dos indivíduos controlo, o que podemos concluir que o músculo não é um órgão de acumulação deste metal. Apesar de não existir na legislação portuguesa nem da União Europeia limites máximos da concentração de cobre no músculo para o consumo humano, comparando os nossos resultados com o valor

estabelecido na legislação para o Reino Unido e para a Espanha, para os quais o limite máximo é de  $20 \mu\text{g.g}^{-1}$  de peso seco, os valores por nós obtidos revelam-se bastante inferiores, o que nos leva a afirmar que não existe qualquer problema no consumo de músculo de peixes expostos a concentrações de cobre entre 0,2 e  $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$  durante um período de 60 dias.

Podemos então concluir que a utilização de sulfato de cobre nas pisciculturas não representa um risco para a saúde pública aquando do consumo do pescado após tratamentos até  $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$  de cobre e, durante um período de tempo de 60 dias.

Não havendo muitos estudos no âmbito dos efeitos do sulfato de cobre, utilizado na prevenção e tratamento de doenças provocadas por parasitas, em espécies marinhas, será necessário uma maior investigação, assim como um estudo mais integrado e uma caracterização individual ao nível de cada tanque para esclarecer e estabelecer quais as concentrações máximas plausíveis de serem utilizadas em pisciculturas, de modo a não afectarem a integridade fisiológica dos peixes assim como, aquando do seu consumo, não afectarem a saúde pública. A futura análise de um período de recuperação, ao qual os peixes anteriormente expostos ao sulfato de cobre ficam num ambiente aquático sem adição de qualquer tipo de tóxico, torna-se um estudo interessante devido a poder-se verificar a recuperação total ou parcial de grande parte dos indivíduos.

## 9. Referências Bibliográficas

- Abellán, E. e García-Alcazar, A. (1995) Pre-growout and growout experiences with white seabream (*Diplodus sargus sargus*, Linnaeus, 1758) and sharpnout seabream (*Diplodus puntazzo*, Cetti, 1977). Marine Aquaculture Finfish Species Diversification, Vol. 16 (ed. C. Zaragoza), pp. 57-63.
- Abellán, E. e Basurco, B. (1999) Options Mediterranean's. In: Marine finfish species diversifications: current situation and prospects in Mediterranean aquaculture. CIHEAH, Zaragoza, Espanha, pp: 1-139
- Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR). (2004) Toxicological profile for copper. U. S. Department of Health and Human Services, Public Health Service Atlanta, USA, pp. 314
- Al-Yousuf, M. H., El-Shahawi, M. S., Al-Ghais, S. M. (2000) Trace metals in liver, skin and muscle of *Lethrinus lentjan* fish species in relation to body length and sex. The Science of the Total Environment 256: 87-94
- Alabaster, J. S. e Lloyd, R. (1980). Water quality criteria for freshwater fish. Butterworths London, UK, pp. 189-214
- Almeida, R. F. (2005) “Veludo Fatal no Azul”: *Amyloodinium ocellatum*. Acedido em Jan. 10, 2011, disponível em: <http://www.aquariofilia.net>
- Alvárez-Pellitero, P. Report about fish parasitic diseases. Consejo Superior de Investigaciones Científicas. Instituto de Acuicultura Torre de la Sal. Ribera de Cabanes, 12595 Castellón, Spain
- Anónimo (1991) B.O.E. 195/1991:27153-27155
- Anónimo (1998) The Council of the European Union. Diário Oficial. L 320: 28-31
- Anónimo (1999) O portal dos consumidores. Acedido em Jan. 12, 2011, disponível em: <http://www.consumidor.pt>
- Anónimo (2011) Propriedades antimicrobianas do cobre: um leque de possibilidades em benefício do ser humano. Acedido em Jan. 12, 2011, disponível em: [http://www.procobre.org/pr/pdf/cp\\_05.pdf](http://www.procobre.org/pr/pdf/cp_05.pdf)
- Antognelli, C., Romani, R., Baldracchini, F., De Santis, A., Andreani, G., Talesa, V. (2003) Different activity of glyoxalase system enzymes in specimens of *Sparus auratus* exposed to sublethal copper concentrations. Chemico-Biological Interactions 142: 297-305
- Arredondo, M. e Núñez, M. T. (2005) Iron and copper metabolism. Molecular Aspects of Medicine 26: 313-327
- Arrelano, J. M., Storch, V., Saraquete, C. (1999a) Histological changes and copper accumulation in liver and gills of the Senegales sole, *Solea senegalensis*. Ecotoxicology and Environmental Safety. 44: 62-72



- Arrelano, J. M., Ortiz, J.B., Capela da Silva, D., González de Canales, M. L., Saraquete, C., Blasco J. (1999b). Levels of copper, zinc, manganese and iron in two fish species from salt marshes of Cadiz Bay (southwest Iberian Peninsula). *Boletino del Instituto Espanol Oceanografia* 15: 485-488
- ATSDR (2004) Toxicological Profile for copper. U.S. Department of Health and Human Services. Agency for Toxic Substances and Disease Registry
- Basurco, B., Lavatelli, A., García, B. (2011) Sparidae: Biology and Aquaculture of Gilthead Sea Bream and Other Species, First Edition. Edited by Michail A. Pavlidis and Constantinos C. Mylonas. Blackwell Publishing Ltd.
- Bauchot, M. L., J.C. Hureau e J.C. Miquel. (1981) Sparidae. In: Fischer, W. G. Bianchi & W. B. Scott (eds). FAO species identification sheets for fishery purpose. Eastern Central Atlantic; fishing areas 34, 47 (in part). Canada funds-in-Trust. Ottawa, Department of fisheries and Oceans Canada, by arrangement with the Food Agriculture and Organization of the United Nations.
- Bauchot, M.L. (1987) Guía de los peces de mar de España y de Europa (2ª ed.), Barcelona: Omega, 432 p.
- Bauchot, M.L. e J.C. Hureau (1990) Sparidae. In: Check-list of the Fishes of the Eastern Tropical Atlantic. Clofeta II, J.C. Quero, J.C. Hureau, C. Karrer, A. Post e L. Saldanha (Editores). Unesco, Paris, p. 790-812.
- Bernet, D., Schmidt, H., Meier, W., Burkhardt-Holm, P., Wahli, T. (1999). Histopathology in fish: proposal for a protocol to assess aquatic pollution. *Journal of Fish Diseases*. 22: 25-34
- Bremner, I. (1987) Involvement of metallothionein in the hepatic metabolism of copper. *Journal of Nutrition* 117: 19-29
- Boeck, G., Smolders, R., Blust, R. (2010) Copper toxicity in gibel carp *Carassius auratus gibelio*: Importance of sodium and glycogen. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C* 152: 332-337
- Buckley, J. T., Roch, M., McCarter, J.A., Rendell, C.A., Matheson, A.T. (1982) Chronic exposure of coho salmon to sublethal concentrations of copper – I. Effect on growth, on accumulation, and distribution of copper, and on copper tolerance. *Comparative Biochemistry and Physiology C: Pharmacology Toxicology and Endocrinology*. 72: 15-19
- Bury, N. R., Walker, P. A., Glover, C. N. (2003). Nutritive metal uptake in teleost fish – review. *The Journal of Experimental Biology*. 206: 11-23
- Caballero, C. C. (2002) Estudio del comportamiento agresivo en pequeños grupos de juveniles de *Diplodus sargus cadenati* de La Paz, Bauchot y Daget, 1974. Tesis Doctoral. Universidad de las Palmas de Gran Canaria.
- Campbell, H. A., Handy, R.D., Nimmo, M. (1999). Copper uptake kinetics across the gills of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) measured using an improved isolated-perfused head technique. *Aquatic Toxicology* 46: 177-190

- Canli, M. & Atli, G. (2003) The relationships between heavy metal (Cd, Cr, Cu, Fe, Pb, Zn) levels and the size of six Mediterranean fish species. *Environmental Pollution* 121: 129-136
- Cao, L., Huang, W., Liu, J., Ye, Z., Dou, S. (2010) Toxicity of short-term copper exposure to early life stages of red sea bream, *Pagrus major*. *Environmental Toxicology and Chemistry*, Vol. 29, No.9, pp. 2044-2052
- Cardigos, F. (2011). O sargo. Departamento de Oceanografia e Pescas, Universidade dos Açores. Acedido em Dez. 20, 2010 disponível em: <http://www.horta.uac.pt/projectos/MSubmerso/old/200204/Diplodus.htm>
- Cerqueira, C. C. C., Fernandes, M. N. (2002) Gill tissue recovery after copper exposure and blood parameter responses in the tropical fish *Prochilodus scrofa*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 52: 83-91
- Chen, C., Wooster, G. A., Bowser, P. R. (2004) Comparative blood chemistry and histopathology of tilapia infected with *Vibrio vulnificus* or *Streptococcus iniae* or exposed to carbon tetrachloride, gentamicin, or copper sulfate. *Aquaculture* 239: 421-443
- Clark, R. B. (2001) *Marine Pollution* (5<sup>th</sup>). Oxford University Press, Oxford, UK. pp. 232
- Daglish, R.W., Nowak, B. F. (2002) Rainbow trout gills are a sensitive biomarker of short-term exposure to waterborne copper. *Archives Environment Contamination and Toxicology*. 43: 98-102
- Decreto – Lei nº 243/2001: Aprova as normas relativas à qualidade da água destinada ao consumo humano transpondo para o direito interno a Directiva n.º 98/83/CE, do Conselho, de 3 de Novembro. Ed. Diário da República, Série I-A, Nº 206 (5 de Setembro de 2001), pp. 5754-5765
- De Boeck, G., Meeus, W., De Coen, W., Blust, R. (2004) Tissue-specific Cu bioaccumulation patterns and differences in sensitivity to waterborne Cu in three freshwater fish: rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), common carp (*Cyprinus carpio*), and gibel carp (*Carassius auratus gibelio*). *Aquatic toxicology*. 70: 179-188
- Díaz, B. C. (2006) Effects of copper in plasma, gills, liver and muscle of seabream (*Sparus aurata*, Linnaeus 1758) juveniles. European Master of Sciences in Aquaculture and Fisheries. Universidade do Algarve, Faculdade de Ciências do Mar e do Ambiente.
- Dural, M., Göksu, M. Z. L., Özak, A.A., Derici, B. (2006) Bioaccumulation of some heavy metals in different tissues of *Dicentrarchus labrax* L., 1758, *Sparus aurata* L., 1758 and *Mugil cephalus* L., 1758 from the Çamlık Lagoon of the Eastern coast of Mediterranean (Tukey). *Environmental Monitoring and Assessment* 118: 65-74
- Eiras, J. C. (1994). Protozoa. In: *Elementos de Ictiopatologia*. Fundação Eng. António de Almeida, Porto, Portugal. pp. 216 - 229
- EPA, U.S. (1985) Ambient water quality criteria for copper – 1984. Washington, D.C., U.S. Environmental Protection Agency. 440/5-84-031

- Evans, D. W., Dodoo, D.K., Hanson, D.J. (1993) Trace element concentration in fish livers: implication of variations with fish size in pollution monitoring. *Marine Pollution Bulletin* 26: 329 – 354
- FAO (2008) The state of world fisheries and aquaculture. FAO Fisheries Department. Food and Agriculture organizations of the United Nations. Rome
- FAO (2010) Fisheries and Aquaculture Department – Species fact sheets. Food and Agriculture organizations of the United Nations. Rome
- FAO (2011) Fisheries and Aquaculture Department – Species fact sheets. Food and Agriculture organizations of the United Nations. Rome
- Fernandes, D., Porte, C., Bebianno, M. J. (2007) Chemical residues and biochemical responses in wild and cultures European sea bass (*Dicentrarchus Labrax* L.). *Environmental Research* 103: 247-256
- Fernandes, D. e Bebianno, M. J. (2009) Assessing pollutant exposure in cultured and wild sea bass (*Dicentrarchus labrax*) from the Iberian Peninsula. *Ecotoxicology* 18: 1043 – 1050
- Franchini, A., Rebecchi, B., Fantin, A. M. B. (1999) Gill endocrine cells in the godfish *Carassius carassius* var. *auratus* and their impairment following experimental lead intoxication. *The Histochemical Journal*. 31: 559-564
- Fonseca, V., Serafim, A., Company, R., Bebianno, M. J., Cabral, H. (2009) Effect of copper exposure on growth, condition índices and biomarker response in juvenile sole *Solea senegalensis*. *Scientia Marine* 73(1): 51 - 58
- Furuno, K., Suetsugu, T., Sugihara, N. (1996) Effect of metal ions on lipid peroxidation in cultures rat hepatocytes loaded with a-linoleic acid. *J. Toxicol. Environ. Health* 48: 121-129
- Gaetke, L. M. & Chow, C. K. (2003) Copper toxicity, oxidative stress, and antioxidant nutrients. *Toxicology*. 189: 147-163
- García-Rosado, E., Cano, I., Martín-António, B., Labella, A., Manchado, M., Alonso, M. C., Castro, D., Borrego, J. J. (2007) Co-occurrence of viral and bacterial pathogens in disease outbreaks affecting newly cultured sparid fish. *International Microbiology*. 10: 193-199
- Georgopoulos, P. G., Roy, A., Yonone-Lioy, M. J., Opiekun, R. E., Lioy, P. J. (2001) COPPER: Environmental Dynamics and human exposure issues. UMDNJ – Robert Wood Johnson Medical School and Rutgers The State University of New Jersey
- Ghatak, D.B. e Konar, S.K. (1990) Acute toxicity of mixture of heavy metals cadmium, pesticide DDVP, detergent Parnol J and petroleum product n-heptane on fish, plankton and worm. *Environmental Ecology* 8: 1239-1248
- Golomazou, E., Athanassopoulou, F., Vagianou, S., Sabatakou, O., Tsantilas, H., Rigos, G., Kokkokiris, L. (2006). Diseases of White Sea Bream (*Diplodus sargus* L.) Reared in Experimental and Commercial Conditions in Greece. *Turk. Journal of Veterinary and Animal Science*, 30: 389-396

- Goss, G. G., Perry, S. F., Fryer, J. N., Laurent, P. (1988) Gill morphology and acid-base regulation in freshwater fishes. *Comparative Biochemistry and Physiology A: Physiology*. 119: 107-115
- Grosell, M., Hansen, H. J. M., Rosenkilde, P. (1998) Cu uptake, metabolism and elimination in fed and starved European eels (*Anguilla Anguilla*) during adaptation to water-borne Cu exposure. *Comparative Biochemistry and Physiology C: Pharmacology Toxicology and Endocrinology*. 120: 295-305
- Grosell, M., McGeer, J. C., Wood, C. M. (2001) Plasma copper clearance and biliary copper excretion are stimulated in copper-acclimated trout. *American Journal of Physiology* 280: 796-806
- Grosell, M., Nielson, C., Bianchini, A. (2002) Sodium turnover rate determines sensitivity to acute copper and silver exposure in freshwater animals. Review. *Comparative Biochemistry and Physiology C: Pharmacology Toxicology and Endocrinology*. 133: 287-303
- Grosell, M., Wood, C. M. (2002) Copper uptake across rainbow trout gills: mechanisms of apical entry. *The Journal of Experimental Biology*. 205: 1179-1188
- Grosell, M., McDonald, M. D., Walsh, P. J., Wood, C. M. (2004) Effects of prolonged copper exposure in the marine gulf toadfish (*Opsanus beta*) II: copper accumulation, drinking rate and  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  - ATPase activity in osmoregulatory tissues. *Aquatic Toxicology* 68: 263-275
- Grosell, M., Blanchard, J., Brix, K. V., Gerdes, R. (2007) Physiology is pivotal for interactions between salinity and acute copper toxicity to fish and invertebrates. *Aquatic Toxicology* 84: 162-172
- Han, F. X., Hargreaves, J. A., Kingery, W. L., Huggett, D. B., Schlenk, D. K. (2001) Accumulation, Distribution, and toxicity of copper in sediments of catfish ponds receiving periodic copper sulfate applications. *Journal of Environmental Quality* 30: 912-919
- Handy, R.D., Eddy, F. B., Baines, H. (2002) Sodium-dependent copper uptake across epithelia: a review of rationale with experimental evidence from gill and intestine. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1566: 104-115
- Harper, A. H., Rodwell, V. W., Mayes, P. A. (1982) *Manual da Química Fisiológica*. Atheneu Editora. São Paulo LTDA. 5ª Edição, pp. 616-617
- Hawke, J. P. (2003). *Diagnosis, treatment, and prevention of disease in mariculture*. International Sustainable Marine Fish Culture, Florida, Harbor Branch Oceanographic Institution Fort Pierce.
- Heath, A.G. (1987) *Water pollution and fish physiology*. Florida, USA, CRC Press, Inc.
- Horne, A. J. e Goldman, C. E. (1974) Suppression of nitrogen fixation by blue-green algae in a eutrophic lake with trace additions of copper. *Science* 183: 409-411
- Hullebusch, E. V., Deluchat, V., Chazal, P. M., Baudu, M. (2002) Environmental impact of two successive chemical treatments in a small shallow eutrophied lake: Part II. Case of copper sulfate. *Environmental Pollution*. 120: 627-634

- Jacob, R., Skala, J., Omaye, S., Turnlund, J. (1987) Effect of varying ascorbic acid intakes on copper absorption and ceruloplasmin levels of young men. *Journal of Nutrition* 117: 2109 – 2115
- Jacobson, S. V. e Reimschuessel, R. (1998) Modulation of superoxide production in goldfish (*Carassius auratus*) exposed to and recovering from sublethal copper levels. *Fish and Shellfish Immunology*. 8: 245-259
- Júnior, R. B. P. (2009) Formação e manejo de um plantel de reprodutores do Beijupirá (*Rachycentron canadum*) em Pernambuco. Programa de Pós-Graduação em Recursos Pesqueiros e Aquicultura. Universidade Federal Rural de Pernambuco
- Kalay, M. e Canli, M. (2000) Elimination of essential (Cu, Zn) and non-essential (Cd, Pb) metals from tissues of a freshwater fish *Tilapia zilli*. *Turkish Journal of Zoology* 24: 429-436.
- Karadede, H. e Üniü, E. (2000) Concentrations of some heavy metals in water, sediment and fish species from the Atatürk Dam Lake (Euphrates), Turkey. *Chemosphere* 41: 1371-1376
- Karakatsouli, N., Papoutsoglou, SE., Manoleosos, G. (2007) Combined effects of rearing density and tank colour on the growth and welfare of juvenile white sea bream *Diplodus sargus* L. in a recirculating water system. *Aquaculture Research*, 37: 87-95
- Karan, V., Vitorović, S., Tutundžić, V., Poleksić, V. (1998) Functional enzymes activity and gill histology of carp after copper sulphate exposure and recovery. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 40: 49-55
- Kargin, F. e Çoğun, H.Y. (1999) Metal interactions during accumulation and elimination of zinc and cadmium in tissues of the freshwater fish *Tilapia nilotica*. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 63: 511-519
- Kleinow, K.M., Nichols, J.W., Hayton, W.L., McKim, J.M., Barron, M.G. (2008) Toxicokinetics in Fishes In: Di Giulio, R.T. e Hinton, D.E. (Eds). *The toxicology of fishes*. Boca Raton: CRC Press, pp 55-154
- Klevay, L. M. (1977) The role of copper and zinc in cholesterol metabolism. *Advances in food and Nutrition Research* 1: 227
- Kraemer, L. D., Campbell, P. G. C., Hare, L. (2005) Dynamics of Cd, Cu and Zn accumulation in organs and sub-cellular fractions in field transplanted juvenile yellow perch (*Perca flavescens*). *Environmental Pollution*. 138: 324-337
- Laurén, J. D., McDonald, D. G. (1987a). Acclimation to copper by rainbow trout, *Salmo gairdneri*: Physiology. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*. 44: 99-104
- Laurén, J.D., McDonald, D.G. (1987b) Acclimation to copper by rainbow trout *Salmo gairdneri*: Biochemistry. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*. 44: 105-111.
- Lenfant, P. (2003) Demographic and genetics structures of white sea bream populations (*Diplodus sargus*, *Linnaeus*, 1758) inside and outside a Mediterranean marine reserve. *Aquaculture*, 226: 751-760

- Ling, R. H. e Tan, C. S. (1990) Control and treatment of some parasites and diseases of freshwater ornamental fish. Aquaculture Proceedings, First International Aquarium Fish and Accessories Conference. Academic Associates Singapore, pp. 81-88
- Ling, K. H., Sin, Y.M., Lam, T. J. (1993) Effect of copper sulphate on ichthyophthiriasis (white spot diseases) in goldfish (*Carassius auratus*). Aquaculture 118: 23-35
- Liu, X. J., Luo, Z., Xiong, B. X., Liu, X., Zhao, Y. H., Hu, G. F., Lv, G. J. (2010) Effect of waterborne copper exposure on growth, hepatic enzymatic activities and histology in *Synechogobius hasta*. Ecotoxicology and Environmental Safety 73: 1286-1291
- MacFarlane, R. D., Bullock, G. L., McLaughlin, J. J. A. (1986) Effects of five metals on susceptibility of striped bass to *Flexibacter columnaris*. Transactions of the America Fisheries Society 115: 227-231
- Maes, G. E., Raeymaekers, J.A.M., Pampoulie, C., Seynaeve, A., Goemans, G., Belpaire, C e Volckaert, F. A. M. (2005) The catadromous European eel *Anguilla Anguilla* (L.) as a model for freshwater evolutionary ecotoxicology: relationship between heavy metal bioaccumulation, condition and genetic variability. Aquatic Toxicology 73: 99-114
- Malheiro, A. (2007) Estudio de la biología del sargo blanco, *Diplodus sargus cadenati* de la paz, bauchot y daget 1974, en aguas de Canarias: Influencias de las características geográficas y climáticas del archipiélago. Tesis Doctoral. Universidade de las Palmas de Gran Canaria
- Mallat, J. (1985) Fish gill structural changes induced by toxicans and other irritants: A statistical review. Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Science. 42: 630-648
- Martinez-López, E., Gravato, C., Garcia-Fernández, A. J. (2007) Evaluación de los efectos del cobre en lubina (*Dicentrarchus labrax*) mediante el uso de biomarcadores y otros parámetros ecológicos. Revista de Toxicología. 24: 2-3
- Mazon, A. F., Fernandes, M. N. (1999) Toxicity and differential tissue accumulation of copper in the tropical freshwater fish, *Prochilodus scrofa* (Prochilodontidae). Bulletin of Environment Contamination and Toxicology. 63: 797 – 804
- Mazon, A. F., Cerqueira, C. C. C., Fernandes, M. N. (2002a) Gill cellular changes induced by copper exposure in the South American tropical freshwater fish *Prochilodus scrofa*. Environmental Research, Section A. 88: 52-63
- Mazon, A. F., Monteiro, E. A. S., Pinheiro, G. H. D., Fernandes, M. N. (2002b) Hematological and physiological changes induced by short-term exposure to copper in the freshwater fish, *Prochilodus scrofa*. Brazilian Journal of Biology. 62: 621-631
- McDonald, D.G. e Wood, C. M. (1993) Branchial mechanisms of acclimation to metals in freshwater fish. In: Fish Ecophysiology. J.C. Rankin e F.B. Jensen (Eds.). London, England, Chapman and Hall: 297-321
- Monteiro, S. M., Santos, N. M. S., Calejo, M., Fontainhas – Fernandes, A., Sousa, M. (2009) Copper toxicity in gills of teleost fish, *Oreochromis niloticus*: Effects in apoptoses induction and cell proliferation. Aquatic Toxicology 94: 219-228

- Morato, T., Afonso, P., Lourinho, P., et al. (2003) Reproductive biology and recruitment of white sea bream in the Azores. *Journal of Fish Biology*, 63(1), 59-72.
- Muhvich, A. G., Jones, R. T., Kane, A. S., Anderson, R. S., Reimschuessel, R. (1995) Effects of chronic copper exposure on the macrophage chemiluminescent response and gill histology in goldfish (*Carassius auratus* L.). *Fish and Shellfish Immunology*. 5: 251-264
- Munari, C. e Mistri, M. (2007) Effect of copper on the scope for growth of clams (*Tapes philippinarum*) from a farming área in the Northern Adriatic Sea. *Marine Environmental Research* 64: 347-357
- NAS (1980) Drinking Water and Health. Washington, D.C., National Academy of Sciences.
- Nero, V., Farwell, A., Lister, A., Van der Kraak, G., Lee, L. E. J., Van Meer, T., MacKinnon, M. D., Dixon, D. G. (2006) Gill and liver histopathological changes in yellow perch (*Perca flavescens*) and goldfish (*Carassius auratus*) exposed to oil sands process-affected water. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 63: 356-377
- Noga, E. J., Levy, M. G. (1995) Dinoflagellida (Phylum Sarcomastigophora). Em: *Fish Diseases and Disorders*. P. Woo (Ed.). Wallingford, CAB International. 1: 1-25.
- Noga, E.J. (1996). *Fish Disease, diagnosis and treatment*. Mosby-Year Book, Inc. St. Louis, Missouri.
- Nowak, B. e Duda, S. (1996) Effects of exposure to sub-lethal levels of copper on growth and health sea framed rainbow trout. *Supervising Scientist report*. 117
- Oropesa-Jiménez, A. L., García-Camero, J. P., Gómez-Gordo, L., Roncero-Cordero, V., Soler-Rodríguez, F. (2005) Gill modifications in the freshwater fish *Cyprinus carpio* after subchronic exposure to simazine. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*. 74: 785-792
- Owens, L. (2003) *Aquaculture: Farming Aquatic Animals and Plants*. Editado por Jonh S Lucas e Paul C Southgate. Blackwell Publishing. Cap. 10
- Papoutsoglou, SE., Karakatsouli, N., Pizzonia G et al. (2006) Effects of rearing density on growth, brain neurotransmitters and liver fatty acid composition of juvenile white sea bream *Diplodus sargus* L. *Aquaculture Research*, 37, 87–95.
- Paris-Palacios, S. e Biagianti-Risbourg (2006) Hepatocyte nuclear structure and subcellular distribution of copper in zebrafish *Brachydanio rerio* and roach *Rutilus rutilus* (Teleostei, Cyprinidae) exposed to copper sulphate. *Aquatic Toxicology* 77: 306-313
- Pedrozo, M. F. M. (2003). Cobre. In Azevedo, FA e Chasin, A. A. (eds). *Metais: Gerenciamento da toxicidade*. São Paulo: editora Atheneu. pp. 143-185.
- Pelgrom, S. M. G. J. (1994) Interactions between copper and cadmium during single and combined exposure in juvenile tilapia *Oreochromis mossambicus*: influence of feeding condition on whole body metal accumulation and the effect of the metals on tissue water and ion content. *Aquatic Toxicology* 30: 117-135

- Pereira, J. C., Lino, P. G., Leitão, A., Joaquim, S., Chaves, R., Pousão-Ferreira, P., Guedes-Pinto, H., Neves dos Santos, M. (2010) Genetic differences between wild and hatchery populations of *Diplodus sargus* and *D. vulgaris* inferred from RAPD markers: implications for production and restocking programs design. *Journal of Applied Genetics* 51(1): 67-72
- Peres, I. L. P. (1991) Contribuição para o estudo ecotoxicológico e histopatológico dos efeitos do cobre na carpa (*Cyprinus carpio* L.). Dissertação apresentada para obtenção do grau de Doutor em Ciências do Ambiente, Especialidade Poluição e Tensões Ambientais, pela Universidade Nova de Lisboa, Faculdade de Ciências e Tecnologia.
- Pérez, L., Infante, C., Ponce, M., Crespo, A., Zuasti, E., Funes, V., Catanese, G., Manchado, M. (2008) Characterization of eight microsatellite markers in the white sea bream, *Diplodus sargus* (Teleostei, Sparidae). *Molecular Ecology Resources* 8: 1291-1293
- Peyghan, R., Razijalaly, M., Baiat, M., Rasekh, A. (2003) Study of bioaccumulation of copper in liver and muscle commons carp *Cyprinus carpio* after copper sulfate bath. *Aquaculture International* 11:597-604
- Pilgaard, L., Malte, H., Jensen, F. B. (1994) Physiological effects and tissue accumulation of copper in freshwater rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) under normoxic and hypoxic conditions. *Aquatic Toxicology* 29: 197 – 212
- Pousão-Ferreira, P., Dore, E., Amaral, J. (1997) White sea bream (*Diplodus sargus*) juvenile production: perspectives for commercial aquaculture. In: Int. Conf. Martinique 97 – Island Aquaculture (Crewell, L. & Harache, Y. eds), pp. 241-242. EAS, Ghent, Belgium.
- Radi, A.A.R. e Matkovics, B. (1988) Effects of metals ions on the antioxidant enzyme activities, protein content and lipid peroxidation of carp tissues. *Comparative Biochemical and Physiology C* 81: 395-399
- Ramos, P. e Oliveira, J. M. (2001) Amiloodiniose em pregado, *Psetta maxima* (L.). *Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias*. 96(540): 201-205
- Ramos, P. (2006) Amiloodiniose em tanques terra: procuram-se soluções!. *Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias*. VI Encontro da Sociedade Portuguesa de Epidemiologia e Medicina Veterinária Preventiva. pp: 319-341
- Rand, G. M. e Petrocelli, S. R. (1985) Fundamentals of aquatic toxicology: methods and applications. New York: Hemisphere. Pp: 1-28
- Reddy, R., Pillai, B. R., Adhikari, S. (2005) Bioaccumulation of copper in post-larvae and juveniles of freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* (de Man) exposed to sub-lethal levels of copper sulfate. *ScienceDirect. Aquaculture*
- Rigos, G., e Katharios, P. (2010) Pathological obstacles of newly-introduced fish species in Mediterranean mariculture: a review. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 20:47 – 70
- Roberts-Thomson, A., Barnes, A., Fielder, D. S., Lester, R. J. G., Adlard, R. D. (2006) Aerosol dispersal of the fish pathogen, *Amyloodinium ocellatum*. *Aquaculture* 257: 118-123



- Rodríguez-Arriza, A., Peinado, J., Puyeo, C., Lopez-Barea, J. (1993) Biochemical indicators of oxidative stress in fish from pollutes littoral areas. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 50: 2568-2573
- Roesijadi, G., Robinson, W. E. (1994) Metal regulation in aquatic animals: mechanisms of uptake, accumulation and release. In Mallins, D.C., Ostrander, G. K. (eds.), *Aquatic Toxicology – Molecular, Biochemical and Cellular Perspectives*. Lewis Publishers/CRC-Press, USA, pp. 387-420
- Romani, R., Antognelli, C., Baldracchini, F., De Santis, A., Isani, G., Giovannini, E., Rosi, G. (2003) Increased acetylcholinesterase activities in specimens of *Sparus auratus* exposed to sublethal copper concentrations. *Chemico-Biological Interactions* 145: 321-329
- Roméo, M.; Bennani, N.; Gnassia-Barelli, M.; Lafaurie, M. e Girard, J.P. (2000) Cadmium and copper display different responses towards oxidative stress in the kidney of the sea bass *Dicentrarchus labrax*. *Aquatic Toxicology* 48: 185-194
- Rowland, S., Mifsud, C. Nixon, M., Read, P., Landos, M. (2009) Use of formalin and copper to control ichthyophthiriosis in the Australian freshwater fish silver perch (*Bidyanus bidyanus* Mitchell). *Aquaculture Research*: 40: 44-54
- Sá, R., Pousão-Ferreira, P., Oliva-Teles, A. (2006) Effect of dietary protein and lipid levels on growth and feed utilization of white sea bream (*Diplodus sargus*) juveniles. *Aquaculture Nutrition*, 12: 310–321
- Sá, R., Pousão-Ferreira, P., Oliva-Teles, A. (2008) Dietary protein requerimento of while sea bream (*Diplodus sargus*) juveniles. *Aquaculture Nutrition*, 14 309–317
- Sasal, P., Morand, S., Guégan, J.-F. (1997) Determinantes of parasite species richness in Mediterranean marine fishes. *Marine Ecology Progress Series*. Vol. 149: 61-71
- Schwarz, M., Smith, S. (2002) Getting Acquainted with *Amyloodinium ocellatum*, Virginia Tech. Virginia Sea Grant College Program. Virginia Cooperative Extension
- Shah, S.L. (2002) Behavioural abnormalities of *Cyprinion watsoni* on exposure to copper and zinc. *Turkish Journal of Zoology* 26: 137-140
- Shao X., Liu, W., Xu, W., Lu, K., Xia, W., Jiang, Y. (2010) Effects of dietary copper sources and levels on performance, copper status, plasma antioxidant activities and relative copper bioavailability in *Carassius auratus gibelio*. *Aquaculture* 308: 60-65
- Shimizu, M., Hochadel, J.F., Waalkes, M.P. (1997) Effects of glutathione depletion on cadmium-induced metallothionein synthesis, cytotoxicity, and proto-oncogene expression in cultured rat myoblast. *Journal of Toxicology and Environmental Health* 51: 609-621
- Sidoumou, Z. Gnassia-Barelli, M., Siau, Y., Morton, V., Roméo, M. (2005) Distribution and concentration of trace metals in tissues of different fish species from the Atlantic Coast of Western Africa. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 74: 988-995
- Sikorska, J. e Wolnicki, J. (2010) Cadmium and copper toxicity to tench *Tinca tinca* (L.) larvae after a short-term exposure. *Review Fish Biology and Fisheries*. 20: 417-423

- Singh, H. S. e Reddy, T.V. (1990) Effect of copper sulfate on haematology, blood chemistry and hepato-somatic index of an Indian cat fish, *Heteropneustes fossilis* (Bloch) and its recovery. *Ecotoxicology Environmental Safety* 20: 30-35
- Smith, D.G.. (2005) Control of *Prymnesium parvum* using ammonium sulfate or copper sulfate in plastic-lined ponds for Koi Carp production. Management of *Prymnesium parvum* at Texas State Fish Hatcheries. PWD RP T3200-1138
- Sobral, P. e Widdows, J. (1997) Effects of copper exposure on the scope for growth of the clam *Ruditapes decussatus* from southern Portugal. *Marine Pollution Bulletin*, Vol. 34, No. 12, pp 992 – 1000
- Straus, D.L. (2003) The acute toxicity of copper to blue tilapia in dilutions of settled pond water. *Aquaculture* 219: 233-240
- Suzuki K. T., Someya, A., Komada, Y., Ogra, Y. (2002) Roles of metallothionein in copper hemostasis: responses to Cu-deficient diets in mice. *Journal of Inorganic Biochemistry*. 88: 173-182
- Tapieiro, H., Townsend, D. M., Tew, K. D. (2003) Trace elements in human physiology and pathology. Copper. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 57: 386-398.
- Tong, S. L., Yap, S. Y., Ishak, I., Devi, S. (1999) Asean Marine Water Quality Criteria for Copper. Marine Environment Division, Water Quality Management Bureau, Pollution Control Department
- Toranzo, A. E., Magariños, B., Romalde, J. L., (2005) A review of the main bacterial fish diseases in mariculture systems. *Aquaculture*, 246: 37-61
- Varanka, Z., Rojik, I., Varanka, I., Nemcsók, J., Ábrahám, M. (2001) Biochemical and morphological changes in carp (*Cyprinus carpio* L.) liver following exposure to copper sulfate and tannic acid. *Comparative Biochemistry and Physiology C* 128: 467-78
- Varo, I., Nunes, B., Amat, F., Torreblanca, A., Guilhermino, L., Navarro, J. C. (2007) Effect of sublethal concentrations of copper sulphate on seabream *Sparus aurata* fingerlings. *Aquatic Living Resources*. 20: 263-270
- Veena, B., Radhakrishnan C. K., Chako, J. (1997) Heavy metal induced biochemical effects in an estuarine teleost. *Indian Journal of Marine Science* 26: 74-78
- Verdiell-Cubedo, D., Oliva-Paterna, F. J., Torralva, M. (2006) Length-weight relationships for 22 fish species of the Mar Menor coastal lagoon (western Mediterranean Sea). *Journal of Applied Ichthyology* 22: 293-294
- Vieira, L. R., Gravato, C., Soares, A. M. V. M., Morgado, F., Guilhermino, L. (2009) Acute effects of copper and mercury on the estuarine fish *Pomatoschistus microps*: Linking biomarkers to behaviour. *Chemosphere* 76: 1416-1427
- Wapnir R. A. (1998) Copper absorption and bioavailability. *American Journal of Clinical Nutrition* 67: 1054 – 1060

- Waser, W., Sahoo, T. P., Herczeg, G., Merilä, J., Nikinmaa, M. (2010) Physiological differentiation among nine-spined stickleback populations: Effects of copper exposure. *Aquatic Toxicology*. 98: 188-195
- Wepener, V., van Vuren, J. H. J., du Preez, H. H. (2001) Uptake and distribution of a copper, iron and zinc mixture in gill, liver and plasma of a freshwater teleost, *Tilapia sparrmanii*. *Water SA*. 27: 99-108
- Wu, S. M., Jong, K.J., Kuo, S.Y. (2003) Effects of copper sulfate on ion balance and growth in *Tilapia* Larvae (*Oreochromis mossambicus*). *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 45: 357-363
- Wurts, W. A. e Perschbacher, W. (1994) Effects of bicarbonate alkalinity and calcium on the acute toxicity of copper juvenile channel catfish (*Ictalurus punctatus*). *Aquaculture*. 125: 73-79
- Yanong, R.P.E. (2009) Use of copper in marine aquaculture and aquarium systems. University of Florida. IFAS Extension. FA165
- Yilmaz, A.B. (2005) Comparison of heavy metal levels of grey Mullet (*Mugil cephalus* L.) and Seabream (*Sparus aurata*) caught in Iskenderun Bay (Turkey). *Turkish Journal of Veterinary and Animal Science* 29: 257-262
- Yilmaz, F., Özdemir, N., Demirak, A., Tuna, A. L. (2007) Heavy metals levels in two fish species *Leuciscus cephalus* and *Lepomis gibbosus*. *Food Chemistry* 100: 830-835
- Zhang, Y. M., Huang, D. J., Wang, Y. Q., Liu, J. H., Yu, R. L., Long, J. (2005) Heavy metal accumulation and tissue damage in goldfish *Carassius auratus*. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*. 75: 1191 – 1199
- Zhao, S., Meng, F., Fu, H., Xiao, J., Gao, Y. (2010) Metallothionein levels in gills and visceral mass of *Ruditapes philippinarum* exposed to sublethal doses of cadmium and copper. *International Conference on Challenges in Environmental Science and Computer Engineering*

## 10. Anexos

### Anexo A – Tabelas das análises toxicológicas

#### Ensaio 1

- Fígado

Nº de análise	Designação da Amostra	Massa da amostra (g)	Concentração de Cu ( $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ )
1	F13, F14, F15	2,119	80,22
2	F16, F17, F18	0,775	49,63
3	F43, F44, F45, F46, F47		150,3
4	F53, F54, F55, F56, F57	0,885	208,1
5	F22, F23, F24	0,774	765,4
6	F19, F20, F21	1,069	125,4
7	F68, F69, F70, F71, F72	2,059	475,2
8	F63, F64, F65, F66, F67	1,544	1091
9	F48, F49, F50, F51, F52	1,834	461,5
10	F25, F27, F26	0,531	36,68
11	F62, F61, F60, F58, F59	1,542	1545
12	F36, F33, F35, F34, F33	2,046	43
13	F28, F29, F30, F31, F32	1,622	101,3
14	F38, F39, F40, F41, F42	1,932	45,17
15	F6	0,416	<LOQ
16	F5	0,115	<LOQ

17	F1	0,122	<LOQ
18	F2	0,103	<LOQ
19	F7	0,477	<LOQ

<LOQ – inferior ao limite de quantificação

- Músculo

Nº de análise	Designação da Amostra	Massa da amostra (g)	Concentração de Cu ( $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ )
20	M25	7,798	7,414
21	M26	9,151	5,714
22	M27	5,841	8,040
23	M56	13,10	2,500
24	M58	12,74	3,130
25	M54	22,19	2,690
26	M53	4,956	7,390
27	M65	15,15	3,310
28	M63	12,79	2,410
29	M50	11,70	1,399
30	M49	13,94	1,846
31	M33	6,937	4,210
32	M48	14,18	2,127
33	M68	14,98	2,073
34	M57	9,019	2,535
35	M28	13,14	2,251
36	M41	9,169	3,829
37	M60	9,308	2,807
38	M23	6,15	8,514
39	M9	11,76	3,259
40	M46	6,467	3,965
41	M11	11,12	2,434
42	M59	4,037	3,748
43	M62	9,391	2,019
44	M29	4,966	3,463
45	M40	7,934	2,093

46	M44	7,009	3,021
47	M61	9,775	2,569
48	M69	12,52	2,644
49	M64	5,828	3,978
50	M42	13,94	1,924
51	M55	4,882	4,762
52	M16	18,04	2,060
53	M10	14,18	2,195
54	M39	23,42	1,863
55	M66	19,95	4,377
56	M70	8,551	4,470
57	M47	8,648	3,687
58	M45	9,327	3,169
59	M51	18,45	2,153
60	M30	13,32	2,764
61	M6	11,34	3,333
62	M32	13,11	3,011
63	M8	3,204	10,25
64	M2	3,395	18,64
65	M43	14,16	2,231
66	M72	9,530	5,094
67	M21	16,91	2,056
68	M35	5,369	6,221
69	M34	22,02	2,655
70	M52	11,31	4,150
71	M5	4,019	10,63
72	M14	26,34	1,291
73	M15	25,07	1,098
74	M7	16,4	1,611
75	M20	21,03	1,103
76	M22	15,59	1,171
77	M37	15,56	1,203
78	M12	12,55	4,622
79	M13	5,345	<LOQ

80	M24	15,67	2,059
81	M36	15,33	1,758
82	M4	11,83	3,674
83	M38	9,785	4,662
84	M17	8,287	4,871
85	M19	10,21	3,192
86	M31	7,195	5,423
87	M18	7,173	5,372
88	M67	8,526	2,311
89	M71	10,45	3,449
90	M3	3,091	<LOQ
91	M1	5,130	29,29

<LOQ – inferior ao limite de quantificação

## Ensaio 2

- Fígado

Nº de análise	Designação da Amostra	Massa da amostra (g)	Concentração de Cu ( $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ )
1	1-04-2011 Fig T1 – a	1,1617	5,296
2	1-04-2011 Fig T2 – b	1,2160	6,330
3	1-04-2011 Fig T2 – a	1,6008	<LOQ
4	1-04-2011 Fig T7 - b	1,0818	158,7
5	1-04-2011 Fig T8 – b	0,6375	122,36
6	1-04-2011 Fig T4 – a	0,5551	27,76
7	1-04-2011 Fig T1 – b	1,6399	14,32
8	1-04-2011 Fig T4 – c	1,2701	39,17
9	1-04-2011 Fig T1 – c	1,4863	<LOQ
10	1-04-2011 Fig T6 – c	0,7166	26,63
11	1-04-2011 Fig T6 – b	1,0476	31,43
12	1-04-2011 Fig T3 – c	1,3900	3,233
13	1-04-2011 Fig T4 – b	1,1011	12,26
14	1-04-2011 Fig T8 – a	0,9773	52,11
15	1-04-2011 Fig T7 – a	1,2108	90,16
16	1-04-2011 Fig T3 – a	1,6853	9,230
17	1-04-2011 Fig T3 – b	1,6430	1,269
18	1-04-2011 Fig T6 – a	0,8659	63,16
19	1-04-2011 Fig T9 – a	1,0228	129,2
20	1-04-2011 Fig T2 – c	1,4034	3,758
21	1-04-2011 Fig T9 – b	0,8630	62,24
22	1-04-2011 Fig T5 – a	1,3659	11,67
23	1-04-2011 Fig T7 – c	1,0404	70,25
24	1-04-2011 Fig T8 – c	1,1426	32,20
25	1-04-2011 Fig T5 – c	0,6536	57,73
26	1-04-2011 Fig T5 – b	1,4633	4,440
27	1-04-2011 Fig T9 – c	1,2985	2,845
28	23-03-2011 Fcontrolo 3c	1,4602	2,778



29	23-03-2011 Fcontrollo 1a	1,1591	<LOQ
30	23-03-2011 Fcontrollo2b	1,2604	8,421
31	2-05-2011 Fig T9 – b	0,7740	13,73
32	2-05-2011 Fig T8 – a	1,3958	<LOQ
33	2-05-2011 Fig T7 – b	1,3017	15,44
34	2-05-2011 Fig T3 – b	1,0602	2,010
35	2-05-2011 Fig T3 – a	1,4112	<LOQ
36	2-05-2011 Fig T5 – c	0,9541	27,30
37	2-05-2011 Fig T8 - c	1,2646	39,59
38	2-05-2011 Fig T8 – b	1,2180	<LOQ
39	2-05-2011 Fig T9 – c	0,5055	10,11
40	2-05-2011 Fig T6 – c	0,9980	18,68
41	2-05-2011 Fig T3 – c	1,4607	5,740
42	2-05-2011 Fig T4 – c	1,7933	6,860
43	2-05-2011 Fig T7 – a	1,6574	6,400
44	2-05-2011 Fig T4 – a	2,5135	4,500
45	2-05-2011 Fig T6 – b	1,7611	9,310
46	2-05-2011 Fig T5 – b	1,2519	5,400
47	2-05-2011 Fig T1 – c	1,7011	5,080
48	2-05-2011 Fig T6 – a	1,3417	2,860
49	2-05-2011 Fig T2 – c	1,2906	5,950
50	2-05-2011 Fig T2 – a	1,6629	2,970
51	2-05-2011 Fig T4 – b	1,5415	1,170
52	2-05-2011 Fig T1 – a	1,7096	5,61
53	2-05-2011 Fig T1 – b	1,4775	2,75
54	2-05-2011 Fig T9 – a	0,6201	67,95
55	2-05-2011 Fig T5 – a	0,7476	28,14
56	2-05-2011 Fig T2 – b	1,3730	3,08
57	2-05-2011 Fig T7 – c	1,3089	1,59
58	16-05-2011 Fig T9 – c	0,5838	42,96
59	16-05-2011 Fig T1 – c	0,9453	9,53
60	16-05-2011 Fig T2 – c	1,7088	5,26

61	16-05-2011 Fig T1 – a	1,4653	12,35
62	16-05-2011 Fig T7 – a	1,3331	12,08
63	16-05-2011 Fig T5 – a	1,1565	16,17
64	16-05-2011 Fig T5 – b	1,0934	9,91
65	16-05-2011 Fig T2 – b	1,1862	10,30
66	16-05-2011 Fig T7 – c	0,8510	20,39
67	16-05-2011 Fig T3 – a	1,3640	2,56
68	16-05-2011 Fig T8 – a	0,5676	61,97
69	16-05-2011 Fig T8 – b	0,6087	127,7
70	16-05-2011 Fig T7 – b	0,9205	33,61
71	16-05-2011 Fig T3 – b	1,0868	9,74
72	16-05-2011 Fig T9 – b	1,1135	33,35
73	16-05-2011 Fig T5 – c	1,1120	19,78
74	16-05-2011 Fig T4 – a	1,2290	15,58
75	16-05-2011 Fig T4 – c	1,1505	26,74
76	16-05-2011 Fig T6 – a	1,1129	9,390
77	16-05-2011 Fig T8 – c	0,6348	17,23
78	16-05-2011 Fig T4 – b	1,6531	11,430
79	16-05-2011 Fig T3 – c	1,0602	7,250
80	16-05-2011 Fig T1 – b	0,8185	15,93
81	16-05-2011 Fig T6 – b	1,2392	15,44
82	16-05-2011 Fig T9 – a	1,3490	31,03
83	16-05-2011 Fig T2 – a	1,6347	4,33
84	16-05-2011 Fig T6 - c	1,2753	14,56
85	15-04-2011 Fig T2 – c	1,7145	<LOQ

86	15-04-2011 Fig T1 – a	1,5641	<LOQ
87	15-04-2011 Fig T1 – b	1,4971	<LOQ
88	15-04-2011 Fig T3 – a	1,6218	<LOQ
89	15-04-2011 Fig T8 – a	0,8042	27,39
90	15-04-2011 Fig T8 – c	0,5038	126,1
91	15-04-2011 Fig T7 – a	1,3148	<LOQ
92	15-04-2011 Fig T7 – c	0,6961	72,13
93	15-04-2011 Fig T1 – c	1,0064	<LOQ
94	15-04-2011 Fig T6 – b	0,9416	16,63
95	15-04-2011 Fig T8 – b	0,5257	<LOQ
96	15-04-2011 Fig T9 – a	1,2034	59,38
97	15-04-2011 Fig T6 – c	1,1818	<LOQ
98	15-04-2011 Fig T7 – b	0,7729	18,91
99	15-04-2011 Fig T2 – b	1,4615	<LOQ
100	15-04-2011 Fig T5 – b	1,3971	8,96
101	15-04-2011 Fig T5 – a	1,3056	<LOQ
102	15-04-2011 Fig T5 – c	1,1488	43,68
103	15-04-2011 Fig T9 – c	0,7778	44,03
104	15-04-2011 Fig T3 – c	1,2348	<LOQ
105	15-04-2011 Fig T9 – b	0,5565	<LOQ
106	15-04-2011 Fig T6 – a	1,4813	<LOQ
107	15-04-2011 Fig T3 – b	1,4122	<LOQ
108	15-04-2011 Fig T2 - a	1,4549	<LOQ

<LOQ – inferior ao limite de quantificação

- Músculo

Nº de análise	Designação da Amostra	Massa da amostra (g)	Concentração de Cu ( $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ )
112	2-05-2011 MusT1 – a	12,2275	2,80
113	2-05-2011 MusT1 – b	13,0136	4,09
114	2-05-2011 MusT1 – c	11,8777	1,34
115	2-05-2011 MusT2 – a	12,8593	2,23
116	2-05-2011 MusT2 – b	12,1760	3,01
117	2-05-2011 MusT2 – c	12,4936	1,41
118	2-05-2011 MusT3 – a	11,1758	4,49
119	2-05-2011 MusT3 – b	10,1205	2,66
120	2-05-2011 MusT3 – c	14,2567	2,59
121	2-05-2011 MusT4 – a	16,1434	1,40
122	2-05-2011 MusT4 – b	10,8054	2,64
123	2-05-2011 MusT4 – c	14,2586	2,31
124	2-05-2011 MusT5 – a	13,5966	2,10
125	2-05-2011 MusT5 – b	13,8828	2,63
126	2-05-2011 MusT5 – c	13,2681	1,39
127	2-05-2011 MusT6 – a	11,3454	1,41
128	2-05-2011 MusT6 – b	12,606	2,33
129	2-05-2011 MusT6 – c	7,2994	2,28
130	2-05-2011 MusT7 – a	6,9236	1,91
131	2-05-2011 MusT7 – b	6,8928	2,12
132	2-05-2011 MusT7 – c	6,9948	4,58
133	2-05-2011 MusT8 – a	6,8437	2,05
134	2-05-2011 MusT8 – b	7,0809	1,09
135	2-05-2011 MusT8 – c	9,4057	<LOQ
136	2-05-2011 MusT9 – a	6,5120	8,18
137	2-05-2011 MusT9 – b	9,8594	1,82
138	2-05-2011 MusT9 – c	8,5925	2,50
139	15-04-2011 MusT5 – a	11,5528	2,80
140	15-04-2011 MusT1 – a	12,8205	2,70
141	15-04-2011 MusT3 – c	14,0173	2,24

142	15-04-2011 MusT7 – c	15,5066	1,68
143	15-04-2011 MusT1 – b	14,1505	1,83
144	15-04-2011 MusT3 – a	15,7798	2,6
145	15-04-2011 MusT1 – c	17,6980	1,83
146	15-04-2011 MusT5 – b	12,1238	1,42
147	15-04-2011 MusT2 – c	16,8122	0,70
148	15-04-2011 MusT2 – b	13,2161	1,98
149	15-04-2011 MusT2 – a	15,4630	1,92
150	15-04-2011 MusT3 – b	15,3947	1,93
151	15-04-2011 MusT6 – c	11,8701	1,34
152	15-04-2011 MusT5 – c	16,0042	1,71
153	15-04-2011 MusT6 – b	18,2007	1,01
154	15-04-2011 MusT7 – a	15,3154	2,22
155	15-04-2011 MusT7 – b	18,2637	1,47
156	15-04-2011 MusT6 – a	18,1963	2,32
157	15-04-2011 MusT8 – c	7,1360	2,53
158	23-03-2011 Mcontrollo c	13,8497	1,89
159	23-03-2011 Mcontrollo b	11,2511	1,59
160	23-03-2011 Mcontrollo a	16,9094	1,69
161	15-04-2011 MusT8 – a	15,7473	1,52
162	15-04-2011 MusT9 - c	15,7911	1,09
163	15-04-2011 MusT9 - b	14,3272	1,24
164	15-04-2011 MusT9 - a	11,0264	1,34
165	15-04-2011 MusT8 - b	20,1595	1,27
166	1-04-2011 MusT4 – b	19,1671	1,66
167	1-04-2011 MusT4 – c	17,5254	1,48
168	1-04-2011 MusT5 – c	14,3725	2,11
169	1-04-2011 MusT5 – b	21,2202	1,35
170	1-04-2011 MusT2 – b	16,0992	0,99
171	1-04-2011 MusT5 – a	20,0401	1,93
172	1-04-2011 MusT2 – a	20,2108	1,73
173	1-04-2011 MusT3 – c	16,9293	1,71
174	1-04-2011 MusT1 – c	22,4030	0,56
175	1-04-2011 MusT1 – a	5,6822	1,51

176	1-04-2011 MusT4 – a	6,6202	1,34
177	1-04-2011 MusT2 – c	9,8679	2,45
178	1-04-2011 MusT1 – b	6,2338	1,73
179	1-04-2011 MusT3 – a	7,7052	1,74
180	1-04-2011 MusT3 – b	7,5629	1,37
181	1-04-2011 MusT7 – c	24,9985	0,67
182	1-04-2011 MusT8 – c	24,5478	0,57
183	1-04-2011 MusT8 – b	13,7094	1,46
184	1-04-2011 MusT6 – a	19,8680	0,64
185	1-04-2011 MusT6 – b	19,6188	0,99
186	1-04-2011 MusT9 – c	20,1475	0,90
187	1-04-2011 MusT8 – a	17,4953	1,69
188	1-04-2011 MusT6 – c	5,8089	1,86
189	1-04-2011 MusT9 – b	14,4098	0,90
190	1-04-2011 MusT9 – a	16,0609	0,66
191	1-04-2011 MusT7 – a	22,5459	1,59
192	1-04-2011 MusT7 - b	13,2381	0,46

<LOQ – inferior ao limite de quantificação

## **Anexo B – Procedimento histológico**

### **Processamento de Material** (Processador TP1020 Leica)

1. Formol	1 h
2. Álcool 70°	1 h
3. Álcool 95°	1 h
4. Álcool 95°	1 h
5. Álcool Absoluto 100°	2 h
6. Álcool Absoluto 100°	2 h
7. Álcool Absoluto 100°	2 h
8. Xilol	2 h
9. Xilol	2 h
10. Xilol	2 h
11. Parafina	2 h
12. Parafina	2 h

Total: 20 h

### **Protocolo de coloração H&E**

1. Desparafinar	15 min
2. Hidratar	5 min
3. Hematoxilina de Gill 2	30 sec
4. Lavar em água destilada	
5. Lavar em água corrente morna	2 min
6. Álcool 70°	1 sec
7. Eosina-Floxina	1 sec
8. Desidratar (Álcool 95° - Álcool 100° - Álcool 100° - Xilol – Xilol)	
9. Clarificar e montar em Entellan®	

### **Resultados**

Núcleos - Azul/Negro

Citoplasma – Rosa

Colagénio e muco – Rosa pálido

## Anexo C – Testes estatísticos efectuados

### Ensaio 1

- Fígado

Dia	Análise Variância	p	Comparações múltiplas	p
23	ANOVA simples	0,024	Tukey HSD	0,721 <sup>1</sup> ; 0,024 <sup>2</sup> ; 0,063 <sup>3</sup>

<sup>1</sup> entre os tratamentos 1 (0,2 mg.L<sup>-1</sup>) e 2 (0,5 mg.L<sup>-1</sup>)

<sup>2</sup> entre os tratamentos 1 (0,2 mg.L<sup>-1</sup>) e 3 (1 mg.L<sup>-1</sup>)

<sup>3</sup> entre os tratamentos 2 (0,5 mg.L<sup>-1</sup>) e 3 (1 mg.L<sup>-1</sup>)

- Músculo

Dia	Análise Variância	p	Comparações múltiplas	p
16	ANOVA simples	0,613	-	-
23	ANOVA simples	0,989	-	-



## Ensaio 2

- Fígado

Análise Variância	p	Comparações múltiplas	Factores	p
ANOVA a 2 factores	<0,000	Tukey HSD	Tratamento	0,093 <sup>1</sup> ; <0,000 <sup>2</sup> ; <0,000 <sup>3</sup>
			Tempo	0,986 <sup>4</sup> ; 0,001 <sup>5</sup> ; 0,035 <sup>6</sup> ; 0,008 <sup>7</sup> ; 0,074 <sup>8</sup> ; 0,744 <sup>9</sup>

<sup>1</sup> entre o controlo e tratamento 1 (0,25 mg.L<sup>-1</sup>)

<sup>2</sup> entre o controlo e tratamento 2 (0,5 mg.L<sup>-1</sup>)

<sup>3</sup> entre o tratamento 1 (0,25 mg.L<sup>-1</sup>) e tratamento 2 (0,5 mg.L<sup>-1</sup>)

<sup>4</sup> entre o dia 15 e 30

<sup>5</sup> entre o dia 15 e 45

<sup>6</sup> entre o dia 15 e 60

<sup>7</sup> entre o dia 30 e 45

<sup>8</sup> entre o dia 30 e 60

<sup>9</sup> entre o dia 45 e 60

Tratamento	Análise Variância	p	Comparações múltiplas	p
Controlo	ANOVA simples	0,379	-	-
Tratamento 1 (0,25 mg.L <sup>-1</sup> )	ANOVA simples	0,047	Tukey HSD	0,873 <sup>1</sup> ; 0,042 <sup>2</sup> ; 0,141 <sup>3</sup> ; 0,610 <sup>4</sup> ; 0,844 <sup>5</sup> ; 0,936 <sup>6</sup>
Tratamento 2 (0,5 mg.L <sup>-1</sup> )	ANOVA simples	0,07	-	-

<sup>1</sup> entre o dia 15 e 30

<sup>2</sup> entre o dia 15 e 45

<sup>3</sup> entre o dia 15 e 60

<sup>4</sup> entre o dia 30 e 45

<sup>5</sup> entre o dia 30 e 60

<sup>6</sup> entre o dia 45 e 60

- Músculo

Análise Variância	p	Comparações múltiplas	p
ANOVA a 2 factores	0,544	-	-

- Análise de Crescimento

Análise Variância	p	Comparações múltiplas	p
ANOVA simples	0,078	-	-

- Quantidade de Alimento consumido

Análise Variância	p	Comparações múltiplas	p
ANOVA simples	<0,000	Tukey HSD	<0,449 <sup>1</sup> ; <0,000 <sup>2</sup> ; <0,000 <sup>3</sup>

<sup>1</sup> entre o controlo e tratamento 1 (0,25 mg.L<sup>-1</sup>)

<sup>2</sup> entre o controlo e tratamento 2 (0,5 mg.L<sup>-1</sup>)

<sup>3</sup> entre o tratamento 1 (0,25 mg.L<sup>-1</sup>) e tratamento 2 (0,5 mg.L<sup>-1</sup>)

## **Anexo D – Publicações decorrentes deste trabalho**

### **D.1. Lesões provocadas pelo cobre utilizado no controlo de ectoparasitas em peixes marinhos**

Aceite para comunicação oral no Congresso de Ciências Veterinárias realizado no dia 15 de Outubro de 2011 em Santarém

#### **Resumo:**

#### **LESÕES PROVOCADAS PELO COBRE UTILIZADO NO CONTROLO DE ECTOPARASITAS EM PEIXES MARINHOS**

Vaz, C<sup>1</sup>; Afonso, F<sup>1</sup>; Soares, F<sup>2</sup>; Barata, M<sup>2</sup>; Pousão-Ferreira, P<sup>2</sup>.

1- Faculdade de Medicina Veterinária, 1300-477 Lisboa, Portugal

E-mail: [fafonso@fmv.utl.pt](mailto:fafonso@fmv.utl.pt)

2 - INRB, I.P. /IPIMAR, Estação Piloto de Piscicultura de Olhão. Av. 5 de Outubro s/n. 8700-305 Olhão, PORTUGAL

O sargo (*Diplodus sargus*, Linnaeus 1758), é uma espécie Mediterrânica com alto valor comercial, o qual tem atraído um elevado interesse por parte dos piscicultores desde a década de 1980, devido a ser considerado um potencial alvo para a diversificação da aquacultura. O recente crescimento desta indústria, juntamente com a introdução de novas espécies de peixes em sistemas de produção intensivos, levou a um aumento da ocorrência e diversidade de agentes patogénicos. O sulfato de cobre tem sido amplamente utilizado para a prevenção e controlo de ectoparasitas, contudo, pode tornar-se tóxico a altas concentrações, comprometendo a integridade fisiológica dos peixes. Ainda que os efeitos toxicológicos do cobre em peixes estejam amplamente documentados, a variabilidade dos resultados apresentados é grande. O principal objectivo deste estudo foi analisar os efeitos de diferentes concentrações de cobre nas brânquias e no fígado de juvenis de sargo (*Diplodus sargus*). Neste ensaio foram distribuídos aleatoriamente 180 indivíduos ( $48.07 \pm 16.4$  g e  $12.8 \pm 1.49$  cm) por 9 tanques, e expostos a  $0.2 \text{ mg L}^{-1}$  (tratamento 1) e  $1 \text{ mg L}^{-1}$  (tratamento 2) de cobre, durante um período de 23 dias.

Os exames histopatológicos revelaram alterações ao nível da estrutura do tecido branquial e hepático, entre os indivíduos expostos a diferentes tratamentos. Este estudo demonstrou alterações mínimas nos peixes submetidos a  $0.2 \text{ mg/L}$ . Nas brânquias foi possível observar edema e hiperplasia ligeira. No fígado observou-se um aumento celular dos hepatócitos com

degenerescência hidrópica. Os peixes expostos a uma concentração de 1 mg/L demonstraram alterações intensas do tecido branquial, nomeadamente, hiperplasia, edema e necrose. No fígado as alterações mais comuns foram a congestão, edema e a necrose celular. O grau de alterações morfológicas observadas diferiu de acordo com o período de exposição e com o tratamento experimental. No entanto, também foram detectadas alterações de intensidade variável entre indivíduos expostos ao mesmo tratamento. Estas serão, possivelmente, devido a diferentes mecanismos de adaptação às diferentes concentrações.

Este trabalho pretende contribuir para um melhor conhecimento sobre a utilização do cobre no controlo de doenças parasitárias, assim como o seu impacto ao nível do metabolismo dos peixes.

## **D.2. Effects of copper treatments in gills, liver and muscle of white sea bream (*Diplodus sargus*, Linnaeus 1758)**

Aceite para poster no Congresso Europeu de Aquacultura realizado entre os dias 18 e 21 de Outubro de 2011 em Rodes, Grécia

### **Resumo:**

#### **EFFECTS OF COPPER TREATMENTS IN GILLS, LIVER AND MUSCLE OF WHITE SEA BREAM (*Diplodus sargus*, Linnaeus 1758)**

Vaz, C<sup>1</sup>; Afonso, F<sup>1</sup>; Soares, F<sup>2</sup>; Barata, M<sup>2</sup>; Belas, A<sup>1</sup>; Carrapiço, B<sup>1</sup>; Pousão-Ferreira, P<sup>2</sup>.

1- Faculdade de Medicina Veterinária, 1300-477 Lisboa, Portugal

E-mail: [fafonso@fmv.utl.pt](mailto:fafonso@fmv.utl.pt)

2 - INRB, I.P. /IPIMAR, Estação Piloto de Piscicultura de Olhão. Av. 5 de Outubro s/n. 8700-305 Olhão, PORTUGAL

### **Introduction**

In aquaculture, diseases can cause severe losses in the production. Copper sulfate is used in aquaculture to control several pathogenic agents. Copper is an essential metal with a recognized biological role and like other heavy metals, it is potentially toxic at high concentrations (Reddy et al., 2005). The aim of this study was to investigate the possible secondary effects of copper sulphate in white sea bream (*Diplodus sargus*) juveniles in the gills, liver and muscle, and to establish the correct amount of Cu that can be used for the treatment without causing irreversible lesions and mortalities.

### **Materials and Methods**

White sea bream juveniles (n=180) of  $48.07 \pm 16.4$  g and  $12.8 \pm 1.49$  cm were randomly distributed in six tanks, triplicate. Fish were kept in the tanks during acclimation (7 days). The fish were exposed to 0.2 mg/L (treatment 1) and 1 mg/L (treatment 2) of copper. Three samplings were collected on days 1, 17 and 23 of the experiment. During the sampling, fish livers and all dorsal-lumbar zone were removed. The samples (livers and muscles) were stored at -20°C until determination of Cu was done. For histologic analysis, liver, gills and muscle samples were fixed in Bouin's fixative, dehydrated in graded ethanol, and embedded in paraffin. Sagittal sections of 5 µm thickness were stained with hematoxylin and eosin (Woods and Ellis, 1994), and then prepared for light microscopy. Tissue determination of Copper was performed by flame atomic absorption spectrometer (Perkin Elmer AAnalyst 700). The measurements were carried out using the following parameters: wavelength 324.8 nm, lamp current 15 mA, slit width 0.7 nm, air 10 L/min and acetylene 2 mL/min. The results were analyzed using one-way analysis of variance (ANOVA).

### **Results**

Our study shows that the concentration of copper in the liver was higher than in the muscle. In the liver, there was a statistically significant difference between fish from different treatment groups (ANOVA,  $p=0.024$ ). The concentration of copper in muscle tissue was not statistically different between fish from the different treatments ( $p=0.613$  and  $p=0.989$ , respectively).

The histopathological study showed minimal change in fish submitted to 0.2 mg/L. In the gills it was observed edema and light hyperplasia. In the liver, the hepatocytes present cell swelling with hydropic degeneration. Fish submitted to a concentration of 1 mg/L showed in the gills extensive changes, namely, hyperplasia, edema and necrosis.

In the liver, congestion, cell swelling and necrosis were the most common visible changes. The main histological observations at the level of individuals exposed gill to various treatments during the test are presented in Table 1.

**Table 1-** The main histopathological observations of the gills of *Diplodus sargus* throughout the test

Lesion	C	T 1 (0,2 mg.L <sup>-1</sup> )		T 2 (1 mg.L <sup>-1</sup> )	
	Day 0	16	23	16	23
Edema	0	0+	++	+	++
Hyperplasia of the gill epithelium	0+	+	+	++	++
Hypertrophy of the gill epithelium	0+	0+	+	++	++
Decrease in the interlayer space	0	+	+	++	++
Incomplete fusion of several lamella	0	+	+	++	++
Complete fusion of several lamella	0	0+	+	+	+
Complete fusion of all lamella	0	0	0+	0+	0+
Necrosis	0	0	0+	+	++

Legend: C – control subjects; T – treatment; 0 away; 0+ this little; + present; ++ this often.

Mortality rates reached 21% in the group treated with 1 mg/L at the end of treatment, while in the other one, only 3% of the fish died.

## Discussion

Copper is essential for fish metabolism; however when their intake is excessively high, toxic effects in the organisms can occur (Fernandes *et al.*, 2007). In this experiment the concentration of 1 mg/L caused significant changes in the gills and in the liver. This is supported by Peyghan *et al.* (2003). In our study the liver accumulated more Cu than muscle. Fish submitted to 0.2 mg/L of Cu, showed minimal changes that can be reversible.

In summary, there is evidence of toxic effect to a higher concentration of Cu, with an increment in liver Cu concentration accompanied by histopathological alterations in fish and leading to 21% mortality. Nevertheless, white sea bream may be able to adapt when reared at low levels of Cu due to their regulatory mechanisms.

Further studies are needed to establish the correct amount of copper that should be used for treatment without causing significant lesions in *Diplodus sargus*, and to observe and to study the tissues after the end of the treatments.

## **Acknowledgments**

To project SEAFARE, for the financial support of this study (Atlantic Area Transnational Programme n° 2009-1/123).

## **Bibliography**

- Fernandes, D., Porte, C., Bebianno, M. J. (2007). Chemical residues and biochemical responses in wild and cultures European sea bass (*Dicentrarchus Labrax* L.). *Environmental Research* 103: 247-256
- Peyghan, R., Razijalaly, M., Baiat, M., Rasekh, A. (2003) Study of bioaccumulation of copper in liver and muscle commons carp *Cyprinus carpio* after copper sulfate bath. *Aquaculture International* 11:597-604
- Reddy, R., Pillai, B. R., Adhikari, S. (2005) Bioaccumulation of copper in post-larvae and juveniles of freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* (de Man) exposed to sub-lethal levels of copper sulfate. ScienceDirect. *Aquaculture*